

Universitat de Lleida



iPSC aplicadas al tratamiento del Parkinson

TRABAJO FINAL DE GRADO

Grado en Biotecnología

Autora: Esther Úbeda Sáez

Tutora: Dra. Marta Llovera Tomas

Curso académico: 2020-2021

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	OBJETIVOS	3
3.	METODOLOGÍA EMPLEADA EN LA REVISIÓN	4
4.	RESULTADOS	5
5.	CONTENIDO DE LA REVISIÓN	8
5.1.	GENERACIÓN DE iPSCs	8
5.1.1.	Proceso de reprogramación de células somáticas a iPSC.....	8
5.1.2.	Métodos de reprogramación	9
5.1.3.	Diferenciación de iPSC a neuronas DA	10
5.2.	MODELADO DE LA EP CON iPSC.....	10
5.2.1.	Modelos con iPSC de EP familiar.....	11
5.2.2.	Modelos con iPSC de EP esporádica	14
5.2.3.	Estudio del envejecimiento y la EP.....	15
5.2.4.	Técnicas de edición de las células iPSC.....	16
5.3.	TEST DE AGENTES TERAPÉUTICOS EN NEURONAS DA DERIVADAS DE iPSCs	17
5.4.	TERAPIA CELULAR.....	19
5.4.1.	Fuente celular	19
5.4.2.	Ubicación del trasplante y estrategia de inervación axonal.....	20
5.4.3.	Seguridad en la generación de las neuronas DA para el trasplante celular.....	21
5.4.4.	Selección del paciente adecuado para el trasplante.....	23
5.4.5.	Respuesta inmune en el trasplante según el origen de las iPSC	24
5.4.6.	Primer trasplante humano con neuronas DA derivadas de iPSC	25
6.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	25
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	27

LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

AMPA: receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

anti-citoqueratina: anticuerpo contra la citoqueratina

anti-KI67: anticuerpo contra la proteína KI67

anti-KU80: anticuerpo contra la proteína KU80

anti-TH: anticuerpo contra la tirosina

anti-TT: anticuerpo contra TT

ARNm: ARN mensajero

ATP: trifosfato de adenosina

BMP: proteína morfogénica ósea

CD31: clúster de diferenciación 31

CD44: clúster de diferenciación 44

CD45: clúster de diferenciación 45

CD90: clúster de diferenciación 90

CHIR o **CHIR99021:** derivado de aminopirimidina

CiRA: Centro de Investigación y Aplicación de células iPS

c-Myc: oncogén viral de mielocitomatosis aviar

CORIN: enzima convertidora de péptido natriurético auricular

COSMIC: catálogo de mutaciones somáticas en el cancer

CREB: unión de elementos de respuesta AMPc

DA: dopaminérgica

DAP: progenitores de DA

DBS: dispositivo para la estimulación cerebral profunda

DJ-1: proteína deglicasa DJ-1

Dppa4: dipeptidil peptidasa-4

E-Cadherin: E-cadherina

EP: enfermedad del Parkinson

EpCam: molécula de adhesión de células epiteliales

ESC: células madre embrionarias

Esrrb: beta receptor relacionado con el estrógeno

FACS: clasificación de células activadas por fluorescencia

FGF8: factor de crecimiento de fibroblastos 8

FOXA2: proteína de caja de horquilla A2

GBA: β -glucosidasa

GID: discinecia inducida por injerto

GMP: buenas prácticas de manufactura

GWAS: estudios de asociación de todo el genoma

GW5074: inhibidor de la quinasa cRaf1

H-E: hematoxilina-eosina

HGMD: base de datos de mutaciones de genes humanos

HLA: antígeno leucocitario humano

HDAC4: histona desacetilasa 4

ICAM1: molécula de adhesión intercelular 1

IRE1 α : enzima 1 α

iPSC: células madre pluripotentes inducidas

Klf4: factor 4 tipo Kruppel

KI67: proteína KI67

LB: cuerpos de Lewy

LC-MS/MS: cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem

L-DOPA: L-3,4-dihidroxifenilalanina

LID: discinecia inducida por L-DOPA

LIN28: proteína homóloga A LIN28

LN: neuritas de Lewy

LRRK2: cinasa rica en repeticiones de leucina 2

MEF2C: factor potenciador 2C específico de miocitos

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridina

MRI: imagen de resonancia magnética

NAB2: proteína 2 de unión a NGFI-A

Nanog: proteína homeobox Nanog

NO: estrés nitrosativo.

Oct4: factor de transcripción 4 de unión al octámero

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

OSKM: Factores Yamanka; Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc

PARK2: ligasa de ubiquitina E3 citoplasmática

PARK7: proteína 7 de la enfermedad del Parkinson

PAX6: proteína de caja apareada PAX6

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PECAM-1: molécula de adhesión de células endoteliales plaquetarias

PET: tomografía por emisión de positrones

PGC α : coactivador del receptor y activado por proliferador de peroxisoma 1 α

PINK1: cinasa inducida por PTEN 1

POU5F1: POU Clase 5 Homeobox 1

PTPIP51: proteína-51 que interactúa con la proteína tirosina fosfatasa

RE: retículo endoplasmático

ROS: especies reactivas de oxígeno

RT-qPCR: PCR cuantitativa de transcripción inversa

SHH: proteína *Sonic Hedgehog*

Shibata: lista de genes

SMAD: proteínas SMAD

SNC: sistema nervioso central

SNCA: alfa sinucleína

SNpc: sustancia negra de la pars compacta

Sox2: proteína Sox2

SOX1: factor de transcripción SRY-Box 1

SSEA-1: antígeno embrionario específico de etapa-1

TALEN: nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción

TRA-2-49: fosfatasa alcalina

TUJ1: beta-tubulina de clase III

UPR: respuesta de la proteína desplegada

VAPB: proteína B asociada a proteínas de membrana asociada a vesículas

VM: mesencéfalo ventral

VPS35: proteína asociada a la clasificación de proteínas vacuolares 35

WES: secuenciación del exoma completo

WGS: secuenciación del genoma completo

WNT: proteínas WNT

WT: tipo salvaje

XBP: proteína 1 de unión a caja X

ZFN: dedos de zinc

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería expresar mi agradecimiento hacia mi tutora, la Dra. Marta Llovera Tomás, por la confianza que ha depositado en mí cuando le propuse la oportunidad de tutorizar mi trabajo de final de grado. Agradezco su esmero, su dedicación y sobretodo, la comunicación que hemos mantenido tan continua y fluida pese a la situación pandémica ante la que nos encontramos. Gracias por resolverme todas las dudas surgidas durante la elaboración de la memoria con una rapidez destacable y por guiarme para llegar al punto en el que me encuentro. Estoy muy agradecida por las referencias y medios nuevos que me ha facilitado y por el enfoque que me ha proporcionado para abordar este proyecto.

En segundo lugar, me gustaría dar las gracias a la Universidad y a los profesores que me han acompañado durante el grado, ya que han contribuido significativamente en mi formación académica. También agradecer a la Unidad de Biblioteca y Documentación de la UdL por elaborar el curso “*Mendeley: nivel básico*” muy completo sobre como utilizar *Mendeley* (gestor bibliográfico). Pese haberse impartido en el segundo año de la carrera, como parte de la asignatura documentación, ha resultado ser de utilidad para refrescar y profundizar mucho más en este gestor bibliográfico. Ha sido una herramienta muy útil y práctica para llevar a cabo las citas y la bibliografía de la revisión.

Por último, pero no menos importante, agradecer también a mi familia, amigos y pareja por el apoyo moral recibido, la comprensión y la ayuda proporcionada.

RESUM

El Parkinson és una malaltia neurodegenerativa que afecta principalment al moviment de les persones. Aquest trastorn s'origina a causa de la pèrdua de les neurones dopaminèrgiques (DA) que són les encarregades de produir dopamina. La malaltia de Parkinson (EP) pot ser genètica (familiar) o idiopàtica (esporàdica). Actualment, les teràpies disponibles només tracten els símptomes i l'estudi de la malaltia està limitat per no disposar de teixit cerebral viu, per aquesta raó, fins al moment la investigació s'havia basat en models animals. No obstant això, la tecnologia iPSC supera aquestes limitacions, ja que permet generar neurones dopaminèrgiques amb les quals establir models per estudiar la malaltia, per testar possibles fàrmacs i fins i tot per dur a terme trasplantaments cel·lulars. En aquesta revisió, primer es detallarà el protocol de reprogramació i diferenciació, és a dir, com transformar les cèl·lules somàtiques en iPSC per després convertir-les en neurones DA. A continuació, s'especificaran alguns models establerts a partir de neurones DA generades per la tècnica de les iPSC per estudiar la patologia de la malaltia quan està associada a mutacions genètiques, és a dir, quan es tracta de l'EP familiar. De la mateixa manera, s'enunciaran models per comprendre l'EP idiopàtica. També mitjançant models de l'EP, s'analitzarà com afecta l'envelliment i els factors ambientals en el desenvolupament de la malaltia i, com les tècniques d'edició del genoma juguen un paper important en ella. Seguidament, s'aportaran els noms de possibles dianes o agents terapèutics contra l'EP. Finalment, es parlarà del trasplantament cel·lular fent èmfasi en: la font cel·lular, la ubicació i l'estratègia de innervació òptima, la seguretat i la resposta immune del trasplantament. S'exposarà el primer trasplantament humà realitzat al Japó amb les neurones DA generades a partir d'iPSC.

RESUMEN

El Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa que afecta principalmente al movimiento de las personas. Este trastorno se origina debido a la pérdida de las neuronas dopaminérgicas (DA) que son las encargadas de producir dopamina. La enfermedad del Parkinson (EP) puede ser genética (familiar) o idiopática (esporádica). Actualmente, las terapias disponibles solo tratan los síntomas y el estudio de la enfermedad está limitado por no disponer de tejido cerebral vivo, por esta razón, hasta el momento la investigación se había basado en modelos animales. Sin embargo, la tecnología iPSC supera estas limitaciones, puesto que permite generar neuronas dopaminérgicas con las que establecer modelos para estudiar la enfermedad, para testar posibles fármacos e incluso para llevar a cabo trasplantes celulares. En esta revisión, primero se detallará el protocolo de reprogramación y diferenciación, es decir, como transformar las células somáticas en iPSC para luego convertirlas en neuronas DA. A continuación, se especificarán algunos modelos establecidos a partir de neuronas DA generadas por la técnica de las iPSC para estudiar la patología de la enfermedad cuando está asociada a mutaciones genéticas, es decir, cuando se trata de la EP familiar. Del mismo modo, se enunciarán modelos para comprender la EP idiopática. También mediante modelos de la EP, se analizará cómo afecta el envejecimiento y los factores ambientales en el desarrollo de la enfermedad y, como las técnicas de edición del genoma juegan un papel importante en ella. Seguidamente, se aportarán los nombres de posibles dianas o agentes terapéuticos contra la EP. Finalmente, se hablará del trasplante celular haciendo hincapié en: la fuente celular, la ubicación y la estrategia de innervación óptima, la seguridad y la respuesta inmune del trasplante. Se expondrá el primer trasplante humano realizado en Japón con las neuronas DA generadas a partir de iPSC.

ABSTRACT

Parkinson is a neurodegenerative disease that mainly affects the movement of people. This disorder originates due to the loss of dopaminergic neurons (DA) that are responsible for producing dopamine. Parkinson's disease (PD) can be genetic (familial) or idiopathic (sporadic). Currently, the available therapies only treat the symptoms and the study of the disease is limited by not having living brain tissue, for this reason, until now the research had been based on animal models. However, iPSC technology overcomes these limitations, since it allows the generation of dopaminergic neurons with which to establish models to study the disease, to test possible drugs and even to carry out cell transplants. In this review, the reprogramming and differentiation protocol will first be detailed, that is, how to transform somatic cells into iPSC and then convert them into DA neurons. Next, some models established from DA neurons generated by the iPSC technique will be specified to study the pathology of the disease when it is associated with genetic mutations, that is, when it comes to familial PD. Similarly, models for understanding idiopathic PD will be enunciated. Also using PD models, it will be analyzed how aging and environmental factors affect the development of the disease and how genome editing techniques play an important role in it. Next, the names of possible targets or therapeutic agents against PD will be provided. Finally, cell transplantation will be discussed with emphasis on: the cell source, the optimal innervation location and strategy, the safety and the immune response of the transplant. The first human transplant carried out in Japan with DA neurons generated from iPSC will be exhibited in this review.

1. Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por primera vez en 1817 por James Parkinson en su “Ensayo sobre la parálisis temblorosa”. Llevó a cabo una descripción detallada de seis pacientes que presentaban los principales signos motores de la enfermedad y que todavía se consideran características de la EP; temblor, bradicinesia y rigidez. Además, observó síntomas mentales de la enfermedad. Después de su muerte, la parálisis temblorosa recibió el nombre de la enfermedad de Parkinson, el trastorno neurodegenerativo más común después del Alzheimer (Salari & Bagheri, 2019; Tysnes & Storstein, 2017).

La EP es un trastorno degenerativo, crónico y progresivo del sistema nervioso central (SNC) que pertenece a un grupo de afecciones conocidas como trastornos del movimiento. Se caracteriza por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas (DA) que son las encargadas de producir la dopamina, el neurotransmisor catecolaminérgico responsable de transmitir señales entre la sustancia negra de la pars compacta (SNpc) y el cuerpo estriado. La pérdida de este mensajero químico conduce a la degeneración de estas conexiones nigra-estriales y a la consiguiente pérdida de los circuitos dopaminérgicos estriales o putaminales, ocasionando patrones anormales de la activación del sistema nervioso que causan el deterioro del movimiento (Irion, 2019; Zygogianni et al., 2019).

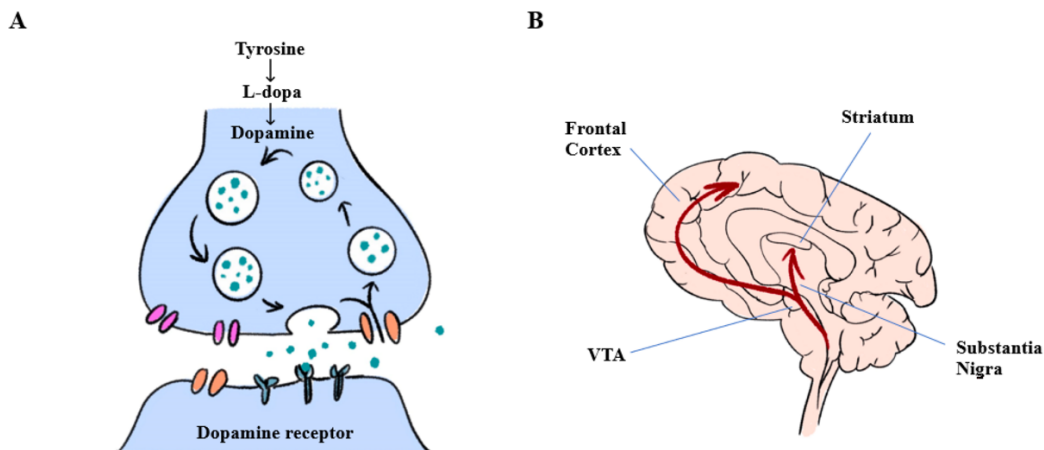


Ilustración 1. Biosíntesis y liberación de dopamina en el cerebro. (A) Las enzimas involucradas en la biosíntesis de la dopamina se expresan en las neuronas DA del mesencéfalo. La tirosina hidroxilasa (TH) convierte la tirosina en L-DOPA, que luego se convierte en dopamina mediante la DOPA descarboxilasa. (B) Vías de la dopamina en el SNC. VTA: área tegmental ventral (Liu & Cheung, 2020).

El sello distintivo patológico de la EP es la acumulación de inclusiones citoplasmáticas filamentosas que consisten principalmente en agregaciones de α -sinucleína (proteína presináptica) en forma de cuerpos de Lewy (LB) o neuritas de Lewy (LN) en las neuronas afectadas. La fosforilación y la fibrilación de esta proteína conducen a la formación de LB e inducen la muerte de las neuronas (Raza et al., 2019).

Los factores o mecanismos involucrados están asociados a la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la activación de las vías apoptóticas y neuroinflamación que finalmente conducen a la degeneración de las enfermedades neuromusculares dopaminérgicas. Estos factores incluyen el aumento de la edad, los factores genéticos y los factores ambientales.

Por lo tanto, las características principales de la EP son el agotamiento de la dopamina y la pérdida de neuronas DA que se cree que son responsables de los síntomas motores y no motores de la enfermedad (De Virgilio et al., 2016; Jamebozorgi et al., 2019). Los primeros síntomas que aparecen son el sueño y trastornos asociados, tales como dificultad postural, temblores leves habla suave, alteraciones en las expresiones faciales normales, pérdida de enfoque, reducción del movimiento de las extremidades, fatiga general y depresión sin ninguna causa obvia. Según avanza la enfermedad, se experimenta la aparición de temblores de reposo unilaterales acompañados de una reducción notable en las actividades voluntarias (bradicinesia) y las dificultades posturales como la rigidez o la inestabilidad postural. Además de las deficiencias de la función motora primaria mencionadas anteriormente, los síntomas motores secundarios como las alteraciones de la marcha, las dificultades del habla, la disfagia (dificultad para tragar), la distonía (contracciones involuntarias de los músculos) y las alteraciones de precisión del agarre empeoran la calidad de vida de las personas afectadas. Los síntomas no motores incluyen síntomas neuropsiquiátricos (depresión, disfunciones cognitivas y demencia), trastornos del sueño (insomnio, trastornos del movimiento ocular rápido, sueños vívidos) y síntomas autónomos (trastornos de la vejiga, estreñimiento, hipotensión ortostática, impotencia eréctil) (Jamebozorgi et al., 2019).

La EP puede ser familiar (genética) o esporádica (idiopática), temprana o tardía, con o sin síntomas. La EP esporádica representa la mayoría de los casos, aproximadamente un 90% de la EP, suele presentarse de forma tardía y no tiene antecedentes familiares claros. Se ha informado que algunos antecedentes genéticos aumentan la incidencia de la EP esporádica, sin embargo, no se definen como enfermedades genéticas porque no se ha demostrado que estén asociadas con el desarrollo de este trastorno. Además, se considera que la exposición a largo plazo a químicos industriales y contaminantes tales como metales, pesticidas y solventes contribuyen al desarrollo de ésta. Por otro lado, la EP familiar representa el 10% de los casos y comparte algunas características clínicas con la EP esporádica (Ke et al., 2019). La EP familiar es causada por mutaciones específicas asociadas con formas autosómicas dominantes y autosómicas recesivas (Stathakos et al., 2020).

Hasta la fecha, las terapias disponibles para la enfermedad sólo tratan los síntomas de ésta. El enfoque terapéutico estándar actual es proporcionar dopamina exógena o elevar los niveles de

dopamina endógena farmacológicamente. Esta terapia, es sintomáticamente efectiva en la etapa inicial, sin embargo, estas terapias se vuelven cada vez menos efectivas con el tiempo, y se acompañan de efectos secundarios graves en las etapas avanzadas de la enfermedad. Algunos pacientes se benefician de la implantación de un dispositivo para la estimulación cerebral profunda (DBS), una terapia que contrarresta los temblores con estímulos eléctricos (Chen et al., 2019; Irion, 2019).

Un factor limitante para la investigación de la EP es la falta de tejido cerebral vivo para estudios invasivos por lo que no se pueden analizar las neuronas en tiempo real. Por este motivo, hasta la fecha, el campo de investigación de la EP se ha basado en modelos animales. La ablación farmacológica de las neuronas DA en modelos EP animales ha sido muy útil para estudiar la degeneración neuronal, pero no reproducen los fenotipos complejos observados en la EP humana (H. Li et al., 2018).

El descubrimiento de la tecnología de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) revolucionó la medicina. La posibilidad de reprogramar células completamente diferenciadas de los pacientes a células indiferenciadas y posteriormente redirigirlas hacia el tipo celular deseado aportó un gran poder a la investigación biomédica. Las iPSC permiten superar algunos de los obstáculos que acarrea la búsqueda de información de la enfermedad, como la especificidad de las vías celulares por especie con el uso de modelos animales, como las cuestiones éticas vinculadas al empleo de células madre embrionarias, así como la falta de tejido cerebral humano *post-mortem*. A partir de las iPSC se obtienen las neuronas que conservan los antecedentes genéticos específicos del paciente, un aspecto clave para el desarrollo de un tratamiento farmacológico personalizado y relevante en el cribado de medicamentos eficaces. Además, la combinación de la tecnología iPSC y las técnicas de edición del genoma permite generar células de control isogénicas que mantienen la misma base genética del paciente lo que supone una gran ventaja en el modelado de trastornos cerebrales complejos como EP (Ferrari et al., 2020). Por último, las iPSC juegan un papel clave en el ámbito de la medicina regenerativa dando lugar a dos tratamientos que solo ahora están al alcance: la terapia celular y el trasplante específico del paciente (Stoddard-Bennett & Reijo Pera, 2019).

2. Objetivos

El objetivo del presente trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre el estado actual de las iPSCs y su uso en el estudio y tratamiento de la enfermedad del Parkinson.

1. Conocer el mecanismo de la generación de las iPSC a partir de las células somáticas y la diferenciación de estas células pluripotentes en neuronas DA.

2. Analizar la aplicabilidad de las iPSC en la creación de modelos para estudiar la patogénesis de la EP, agentes o dianas terapéuticas y las técnicas de edición genética utilizadas para crear líneas isogénicas en el modelado de la enfermedad.
3. Valorar la aplicación clínica (trasplantes celulares) de las neuronas DA derivadas de las iPSC y sus aspectos clave para llevar a cabo los injertos celulares con éxito y seguridad.

3. Metodología empleada en la revisión

En esta revisión bibliográfica se ha realizado una búsqueda de información relacionada con la enfermedad del Parkinson y el uso en ella de las células madre pluripotentes inducidas.

Inicialmente, se llevó a cabo una búsqueda general en *Google Scholar* y en algunas páginas oficiales tales como *National Institutes of Health* (NIH), concretamente en *National Institute of Neurological Disorders*, para familiarizarse con algunos aspectos relevantes del trastorno y para indagar sobre las iPSC, un término científico novedoso el cual acarrea mucho interés en la actualidad. Para profundizar más con el tema, se han empleado bases de datos genéricas tales como *PubMed (NCBI)*, *Scopus*, *Science Direct*, *Web of Science*, *SciELO*, *SciFinder*. De entre todas las bases de datos citadas, las cuatro primeras han sido las más recurridas para la elaboración del trabajo. También se consultaron una gran variedad de artículos en revistas como *Springer Link*, *Nature*, *Cell* y *Science*. Todas estas fuentes proporcionaron un gran abanico de información que ha permitido organizar el contenido de este trabajo.

En el proceso de la búsqueda bibliográfica, en las bases de datos mencionadas, se emplearon diferentes combinaciones de palabras clave relacionadas con la temática: “*Parkinson disease*”, “*Parkinson’s disease types*”, “*Dopaminergic neurons stem cells iPS*”, “*iPSC Parkinson*”, “*iPS models Parkinson disease*”, “*Parkinson disease cell therapy*”, “*Parkinson’s editing technology*” y “*iPSC parkinson’s editing technology*”. De este modo se consiguió un barrido de artículos y documentos varios donde aparecían las palabras filtradas en los títulos o en el contenido. En principio, los artículos se ordenaron de mayor a menor relevancia, hecho que permitió una comprensión mayor de la EP y de las iPSC. Luego, debido a que aparecían artículos muy antiguos, se seleccionó la opción de filtrar por año, centrando un mayor interés en aquellos más recientes y considerados como novedosos. No obstante, algunos documentos relevantes, pero no novedosos, también se han utilizado para suplir la revisión bibliográfica de algunos datos clave.

Una vez consultada la información proporcionada por las bases de datos y teniendo el conocimiento necesario de cuáles son los ámbitos de la enfermedad en que se han utilizado las iPSC, se procedió a una búsqueda más exhaustiva de diferentes ensayos clínicos. Fueron

consultados principalmente en *ClinicalTrials.gov* y en *UMIN Clinical Trials Registry* y permitieron conocer el estado actual de los trasplantes celulares derivados de iPSC y potenciales terapéuticos testados en neuronas DA derivadas de iPSC, así como la eficacia y la seguridad de éstos. De este modo se pudo acabar de completar y aportar detalles más minuciosos en la revisión bibliográfica presentada.

4. Resultados

En este apartado se muestran mediante diferentes recursos visuales los resultados de las búsquedas principales llevadas a cabo con el fin de ver la contextualización y la repercusión que acarrea el tema elegido. De este modo, se puede observar la transcendencia de la investigación de las iPSC aplicadas en el ámbito de la enfermedad del Parkinson y los documentos de interés científico publicados en bases de datos potentes.

Se han consultado todos los documentos considerados de interés y de entre ellos, se han seleccionado 93 para la elaboración de la revisión tal y como se puede apreciar en la bibliografía. Los demás, han sido descartados puesto que se ha considerado que la información no se ajustaba al tema tratado o bien la forma de abordarlo no correspondía con el objetivo que se tenía. No obstante, estos documentos han sido relevantes para contrastar las ideas principales o para corroborar la información recopilada de los documentos utilizados.

A continuación, se representa el **Figura 1** que muestra los documentos publicados por año en la base de datos *Scopus*. En las demás bases de datos, se observa una dinámica similar, pero se ha escogido representar los resultados de la base de datos *Scopus*, ya que es la más amplia en cuanto al número de documentos publicados se refiere. Con respecto a las palabras clave filtradas, se han elegido las siguientes “iPSC” y “Parkinson”, para representar la imagen, obteniendo 1565 publicaciones en total. Esta filtración y esta base de datos, han permitido englobar las demás palabras clave mencionadas en el apartado de la metodología. En este gráfico se observa como los documentos publicados crecen exponencialmente a partir del 2008, alcanzando los 230 documentos publicados en el año 2020. Este hecho corrobora que la utilización de las iPSC para estudiar y tratar la EP es un tema de investigación muy activo en la actualidad. El gráfico ha sido acotado desde el año 2008 y no anteriores a él, ya que el número de publicaciones en los años previos, eran inferiores a 4 y los documentos se han considerado demasiado antiguos.

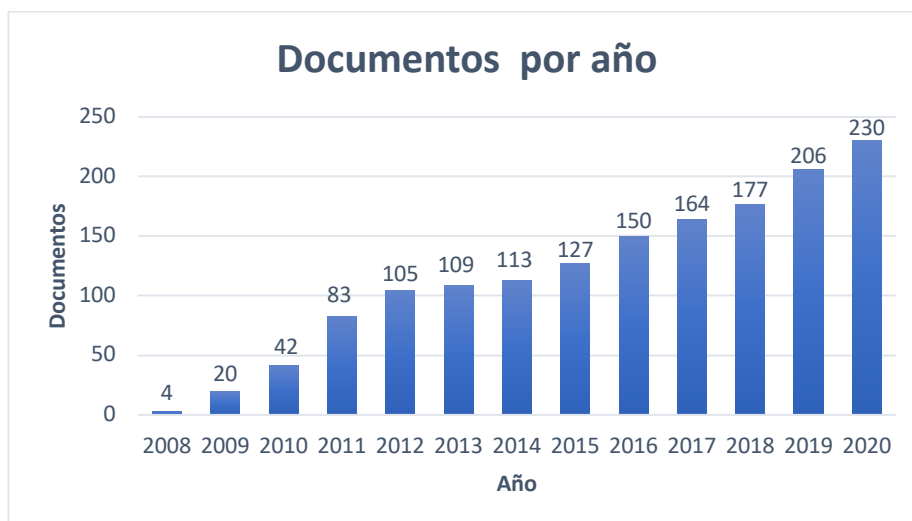


Figura 1. Número de publicaciones por año relacionadas con las iPSC y el Parkinson obtenidas de Scopus.

En cuanto al tipo de documentos científicos publicados que aborda esta disciplina, se distingue que el 64.5% son artículos científicos y el 27% revisiones. El 8.5% restante se reparte entre reseñas de conferencias, artículos de conferencias, editoriales, capítulos de libros, libros y breves encuestas.

También se ha elaborado un gráfico (**Figura 2**) en el que se puede observar el número de documentos publicados según el área de investigación. De las 1565 publicaciones obtenidas con las palabras clave “iPSC” y “Parkinson”:

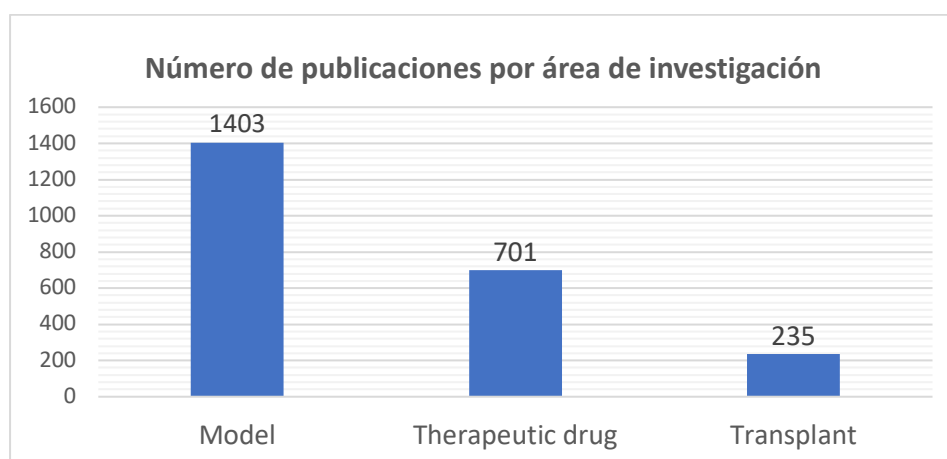


Figura 2. Número de publicación según el área de investigación de las iPSC en la EP y con las siguientes palabras filtradas: “model”, “therapeutic drug” o “transplant”.

- 1403 (89%) están relacionadas con investigaciones que emplean las iPSC para el modelaje de la EP. Además de las otras dos palabras claves, se ha filtrado la palabra “model” para acotar aún más la búsqueda.
- 701 (45%) resultados emergen con las palabras adicionales “therapeutic” y “drug”. En estos resultados se han encontrado publicaciones relacionadas con la obtención de

agentes y dianas terapéuticas mediante las neuronas DA obtenidas de iPSC de pacientes con la EP.

- 235 (15%) resultados aparecen con la palabra “*transplant*” filtrada.

Como se puede observar el número de publicaciones relacionadas con el modelaje de la enfermedad es mayor frente al número de documentos publicados relacionados con el trasplante celular, quedando el número de publicaciones de posibles fármacos en una posición intermedia entre ambos. Esto explica por qué el número de citas relacionadas con los modelos de neuronas DA derivadas de iPSC de pacientes con la EP para estudiar los mecanismos patológicos de la enfermedad son mayores con respecto al número de citas relacionadas con el trasplante en la revisión bibliográfica realizada.

No obstante, para enriquecer la información sustraída de los artículos científicos que relataban las investigaciones de los trasplantes en el ámbito de la EP, se realizó una exhaustiva búsqueda de ensayos clínicos en ClinicalTrials.gov y en *UMIN Clinical Trials Registry*. En la siguiente tabla (**Tabla 1**), se exponen dichos ensayos y se proporciona una breve descripción de los que se han utilizado para la elaboración de la memoria. Todos, salvo el número 3 tienen como finalidad su uso como terapia de trasplante. Los cuatro ensayos que realizan trasplante de células utilizan como fuente células madre pluripotentes diferenciadas *in vitro* a precursores neurales, un estudio utiliza células madre embrionales (ESC) y los otros tres, células madre pluripotentes inducidas (iPSC).

Tabla 1 .Estudios clínicos relevantes para la temática del trabajo de ClinicalTrials.gov i UMIN Clinical Trials Registry

	Título	Estado	Identificador	Intervenciones	Localizaciones
1	Safety and Efficacy of Autologous Neural Stem Cells in the Treatment of Parkinson's Disease	Aún sin reclutar	NCT03815071	<u>Fármaco:</u> iPS-NSC <i>Estudio de etiqueta abierta (open-label study) para investigar la seguridad y eficacia de iPS-NCS con EP</i>	No se proporcionan contactos ni ubicaciones
2	Kyoto Trial to Evaluate the Safety and Efficacy of iPSC-derived dopaminergic progenitors in the treatment of Parkinson's Disease	Suspendido	UMIN000033564	<u>Biológico:</u> trasplante de progenitores DA derivados de hiPSCs en el putamen bilateral mediante el sistema de cirugía cerebral estereotáctica. <u>Fármaco:</u> inmunosupresor	Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto, Japón
3	Derivation of Induced Pluripotent Stem Cells From Somatic Cells Donated by Patients With Neurological Diseases for the Study of the Pathogenesis of the Disorders and Development of Novel Therapies	Reclutando	NCT00874783	<u>No proporcionados.</u> El proyecto consistía en desarrollar hiPCS a partir de cultivos celulares de biopsias de piel o del cabello del paciente para modelar enfermedades y descubrir fármacos, así como para la investigación básica, y para desarrollar la tecnología para futuras terapias de trasplantes. Las iPSC en este estudio no están diseñadas para su uso en terapia de trasplante.	Hadassah Ein Kerem Jerusalem, Israel
4	Safety and Efficacy of Striatum Transplantation of Human Embryonic Stem Cells-derived Neural Precursor Cells in Patients With Parkinson's Disease	Desconocido (El estado de reclutamiento fue: Reclutando)	NCT03119636	<u>Biológico:</u> trasplante de NPC. Las células se implantan estereotóticamente en el cuerpo estriado <u>Fármaco:</u> Levodopa (según la condición del paciente).	Hopital universitario de Zhengzhou, Henan, China
5	Safety and Tolerability of ISC-hpNSC Injected Into the Striatum and Substantia Nigra of Patients With Parkinson's Disease	Activo, no reclutando	NCT02452723	<u>Biológico:</u> ISC-hpNSC ISC-hpNSC se inyectará por vía intracerebral en el cuerpo estriado y la sustancia negra de los pacientes con EP.	Departamento de Neurología, The Royal Melbourne Hospital, Victoria, Australia

5. Contenido de la revisión

5.1. Generación de iPSCs

La investigación sobre enfermedades neurológicas ha avanzado rápidamente en las últimas décadas gracias al descubrimiento de la reprogramación celular. Las células somáticas son reprogramadas para revertir su estado diferenciado a un estado indiferenciado y pluripotente obteniendo las células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Las iPSC comparten muchas características con las células madre embrionarias (ESC) como la capacidad de autorenovación, perfiles de expresión génica, la morfología y la capacidad para diferenciarse en células de las tres capas germinales embrionarias *in vitro* e *in vivo* (Torrent et al., 2015).

En 2006, Takahashi y Yamanaka lograron la reprogramación de células somáticas a iPSCs utilizando la transducción retroviral de Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (conocidos como factores de Yamanaka o con el nombre de OSKM) en fibroblastos embrionarios de ratón. La expresión ectópica de OSKM provoca la reprogramación del epigenoma de las células de un fibroblasto a un estado pluripotente y genera iPSC (H. Li et al., 2018). En 2007, los grupos de Yamanaka y James Thomson informaron por separado que las células somáticas humanas se pueden reprogramar en iPSC utilizando OSKM o una combinación alternativa de factores de transcripción (TF): Oct4, Sox2, Nanog y Lin28 (Chen et al., 2019). Los fibroblastos y las células sanguíneas siguen siendo los tipos de células somáticas más populares para la reprogramación, pero también se han utilizado otras células de diferentes linajes para generar iPSC (Vadodaria et al., 2020).

5.1.1. Proceso de reprogramación de células somáticas a iPSC

Cómo actúan exactamente los OSKM, conocidos como factores pioneros, todavía está en investigación. El perfil de expresión génica en fibroblastos descubrió tres fases de reprogramación denominadas **iniciación**, **maduración** y **estabilización** (Cai et al., 2015; Rai et al., 2020). Los factores OSKM se unen a regiones de cromatina no accesible para otros factores de transcripción (factores convencionales) y conducen a la remodelación de esta, activando o reprimiendo la expresión génica (Amin et al., 2019; K. Takahashi & Yamanaka, 2016).

En la primera fase de la reprogramación c-Myc (un protooncogén que promueve la proliferación y la supervivencia celular) se une a H3K4 metilado (una marca de cromatina abierta) para empezar con la pérdida de la naturaleza somática. Estos loci contienen potenciadores y promotores de genes que determinan la identidad somática de la célula y este hecho conduce al silenciamiento de los genes somáticos. Los OSKM primero se unen a los potenciadores y

luego a los promotores asociados a la pluripotencia temprana. Los cambios que se producen en la primera fase son la transición epitelio-mesénquima, la señalización de la proteína BMP y la inhibición de proteínas apoptóticas con alta tasa de proliferación. También tiene lugar la modificación de las histonas, seguidamente la desmetilación del ADN y la reactivación del cromosoma X. Todos estos procesos derivan en una reprogramación parcial de las células. El principio de la reprogramación es un proceso estocástico (evento aleatorio, no predecible) e ineficiente debido a las marcas represivas de metilhistonas que cubren muchos genes involucrados en la inducción de pluripotencia y son responsables de la conformación cerrada de la cromatina. Este obstáculo se puede paliar mediante inhibidores de la histona desacetilasas.

En la segunda fase de la reprogramación se expresan los genes de pluripotencia tardía y las células se preparan para la independencia transgénica. Este es un proceso determinista (eventos de reprogramación sincronizados y predecibles). Los OSKM acceden a los genes de pluripotencia tardía y a los reguladores del desarrollo. En la última fase ocurre una remodelación del citoesqueleto, se produce la autorenovación transgénica, el alargamiento de los telómeros por activación de expresión de la telomerasa y la pérdida de memoria epigenética. Todos estos eventos, finalmente, dan lugar a las células totalmente reprogramadas que son pluripotentes (K. Takahashi & Yamanaka, 2016).

Se ha demostrado que la primera ola transcripcional se produce en todas las células y está mediada principalmente por c-Myc, mientras que la segunda ola es impulsada por Oct4/ Sox2/ Klf4 (Cai et al., 2015).

Podemos ir monitoreando el proceso de reprogramación de células debido a los marcadores presentes en las células. La fase de inicio ha sido reconocida por la ganancia de marcadores como la fosfatasa alcalina, SSEA-1, E-cadherina (E-Cadh) y la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCam) y la pérdida de antígenos de la superficie celular: CD90 y CD44. La fase de maduración se caracteriza por la presencia de Nanog, Oct4, Esrrb y CD45 o molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM1). Por último, la fase de estabilización expresa marcadores como Sox2, pluripotencia del desarrollo asociada 4 (Dppa4) y CD31 o molécula de adhesión de células endoteliales y plaquetas (PECAM-1) (Rai et al., 2020).

5.1.2. Métodos de reprogramación

Los métodos de reprogramación se pueden dividir en dos grandes grupos: integrativos y no integrativos. Los métodos de reprogramación que utilizan retrovirus, lentivirus o transposones introducen transgenes en el genoma de las células que se reprograman y ello conlleva el riesgo de mutaciones de inserción y transformación oncogénica, ya que tanto c-Myc como Klf4 son

oncogenes (H. Li et al., 2018). Para evitar el riesgo de tumorigénesis, se han desarrollado varios métodos de reprogramación sin integración genómica que incluyen vectores virales no integrativos como el virus Sendai, adenovirus y vectores no virales como ADN episomal, transposones Piggy-Bac, ARN mensajero sintético modificado (ARNm), microARN y proteínas recombinantes. Los métodos de reprogramación más usados para generar iPSC son el virus Sendai, los ARNm sintéticos y los ADN episomales debido a su alta eficiencia de reprogramación y su amplia aplicación a diferentes tipos de células (Shi et al., 2017).

5.1.3. Diferenciación de iPSC a neuronas DA

La diferenciación de las iPSC a las neuronas DA maduras del cerebro medio imita una vía específica en el desarrollo embrionario. Los métodos de diferenciación pueden seguir dos variantes, por un lado, mediante moléculas pequeñas y factores neurotróficos y por el otro, mediante transfección de factores de transcripción. Los protocolos de diferenciación que utilizan pequeñas moléculas y factores neurotróficos imitan el patrón *in vivo* de la placa del piso neural al activar la vía de *Sonic Hedgehog* (SHH), la inhibición de SMAD y la adición del FGF8 (Kirkeby et al., 2012). De otro modo, tal y como se ha mencionado anteriormente, la diferenciación puede lograrse mediante la transfección de los factores transcripcionales, pero su integración espontánea impide la aplicación de estos métodos de cualquier a nivel clínico. El tipo celular neuronal deseado (neuronas DA) se consigue mediante la adición de la molécula de señalización activadora de WNT CHIR99021 (CHIR). Cuanto más CHIR se añade, más características del cerebro posterior adoptan las neuronas DA (Cheng et al., 2014; Fasano et al., 2010; Mahajani et al., 2019).

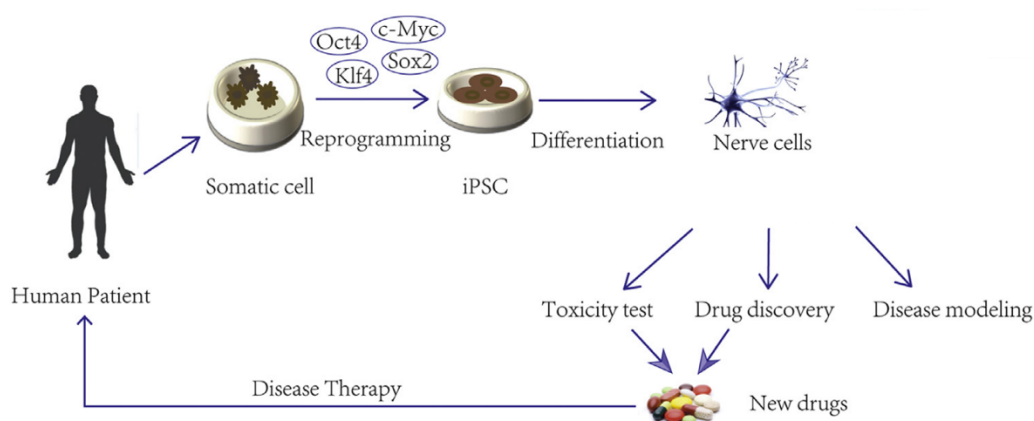


Ilustración 2. Aplicación de iPSC en el ámbito de la EP (Amin et al., 2019).

5.2. Modelado de la EP con iPSC

Para comprender mejor la EP, los investigadores han buscado modelos que reflejen las manifestaciones fenotípicas de la enfermedad. Hasta la fecha, los investigadores han utilizado

organismos modelo (levadura, ratones, *Drosophila* y primates no humanos). En un primer momento, la estrategia consistía en la destrucción de la vía nigroestriatal mediante toxinas. Los organismos eran sometidos a inyecciones directas en el SNC de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridina (MPTP) para imitar la muerte celular de las neuronas DA en la SNpc a través de promover estrés oxidativo. Este modelo, inducido artificialmente, resulta útil para examinar los efectos del bloqueo de la expresión de dopamina pero no refleja la neuropatología subyacente de las neuronas DA ni la formación típica de neuritas y cuerpos de Lewy (Simon et al., 2020). Otra estrategia consistía en la sobreexpresión de los factores de riesgo humanos en modelos animales, mostrando así la degeneración de las neuronas DA dependiente de la edad similar al fenotipo patológico humano (Koprich et al., 2017).

Para revelar la etiología e identificar los mecanismos que causan a EP, se han utilizado líneas de iPSC como modelos para estudiar la enfermedad. Estos modelos permiten reproducir a nivel celular y molecular, los mecanismos implicados en la EP puesto que preservan la maquinaria molecular nativa, las vías de transcripción propias y su susceptibilidad apoptótica natural de las neuronas DA (Playne & Connor, 2017; Shi et al., 2017). Además de abordar los hallazgos moleculares, las neuronas DA derivadas de iPSC conllevan las diferentes variantes genéticas individuales y la respuesta específica del paciente a intervenciones específicas como la aplicación de toxinas o la imitación del envejecimiento *in vitro*, ya que la EP es el resultado de una interacción compleja de factores ambientales y genéticos (Playne & Connor, 2017; Sánchez-Danés et al., 2012).

Los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) pueden identificar factores de riesgo de polimorfismos y mutaciones para la EP, pero los modelos iPSC permiten una visualización fenotípicamente similar de estos efectos. De manera similar, sus efectos sobre la muerte celular y la susceptibilidad se pueden cuantificar y comparar en condiciones controladas (Simmacher et al., 2020).

5.2.1. Modelos con iPSC de EP familiar

La EP familiar comprende alrededor de 5-10% de los casos de la EP, dónde los factores genéticos juegan un papel importante en la comprensión de la etiología de la enfermedad. El uso de iPSC de la EP familiar aborda la contribución de los factores genéticos individuales y la relevancia funcional de las vías moleculares subyacentes en el desarrollo de la EP (Simon et al., 2020). Los genes mutantes comunes relacionados con la EP incluyen la sinucleína alfa (SNCA), la cinasa rica en repeticiones de leucina 2 (LRRK2) también conocida como dardina, la cinasa inducida por PTEN 1 (PINK1) o Parkin, la ligasa de ubiquitina E3 parkina (PARK2), PARK7 (codifica DJ-1), y proteína asociada a la clasificación de proteínas vacuolares 35

(VPS35). Entre ellos, SNCA, LRRK2 y VPS35 se asocian con la EP en formas autosómicas dominantes, y PINK1, PARK2 y PARK7 se asocian con la EP en formas autosómicas recesivas. Además, los estudios de asociación de todo el genoma han encontrado que muchas variantes de la β -glucosidasa (GBA) son factores de riesgo para la EP (Hu et al., 2020).

El sello distintivo patológico de la EP es la acumulación α -sinucleína, una proteína sináptica que está codificada por el gen SNCA. Los genes mutados puntualmente (A53T, A30P, E64K, H50Q, G51D y A53E), por duplicación y por triplicación son mutaciones familiares de la EP y en la que los pacientes que las padecen, se observan que el nivel de α -sinucleína en la región mesencefálica es tres veces mayor que en las células somáticas y presentan conformaciones distintas de la proteína, todo ello da lugar a los cuerpos de Lewy. Se generaron varias líneas de iPSC mutantes SNCA A53T de SNCA o por triplicación, las neuronas DA contenían niveles elevados de α -sinucleína y en estas se podían observar los fenotipos de la EP (Soldner et al., 2011). Por un lado, la acumulación de esta proteína conlleva la sobreexpresión intrínseca de los marcadores de estrés oxidativo y la oxidación inducida por peróxido (Byers et al., 2011). Además, induce el estrés en el retículo endoplásmico activando la respuesta de la proteína desplegada (UPR) del eje IRE1 α / XBP (Heman-Ackah et al., 2017). Cuando se somete a estrés oxidativo, la α -sinucleína extranuclear es escindida por los proteasomas. Los fragmentos pequeños ingresan al núcleo e inducen daño al ADN nuclear y senescencia nuclear mientras que los fragmentos grandes aumentan los niveles de ROS (Milanese et al., 2018). Por otro lado, se une a las proteínas reguladoras del transporte Miro1, KLC1, Tau y, de este modo, altera el transporte axonal mitocondrial en las terminaciones sinápticas. Además, la presencia de niveles elevados de α -sinucleína conduce a una disminución de la densidad axonal y una degradación sináptica estructural de las neuronas derivadas de iPSC (X. Li et al., 2016; Prots et al., 2018). El siguiente acontecimiento es la interacción de α -sinucleína con la β -glucosidasa para promover la disfunción lisosomal al interrumpir el tráfico de la hidrolasa (Mazzulli et al., 2016). El exceso de α -sinucleína promueve la unión de la subunidad β de la ATPsintasa y de lípidos para abrir los poros mitocondriales (Ludtmann et al., 2018) y también se combina con cardiolipina para aumentar la exposición a cardiolipina en la superficie mitocondrial (Ryan et al., 2018). La exposición prolongada de cardiolipina promueve la autofagia mitocondrial. Además, se une a la proteína de unión del retículo endoplásmico-mitocondrial VAPB, interrumpiendo la cadena VAPB-PTPIP51 para alterar la homeostasis del calcio y la producción de ATP mitocondrial (Paillusson et al., 2017).

Por otro lado, también se ha visto implicado el gen LRRK2. Se han encontrado que las mutaciones puntuales N1437H, R1441C y G2019S de LRRK2 causan EP, entre las cuales, G2019S es la mutación familiar de la EP más común y más estudiada en LRRK2. Muchos

estudios que utilizan neuronas DA derivadas de iPSC muestran los siguientes fenotipos *in vitro* del mutante LRRK2: 1) se observa que el nivel de α -sinucleína así como su agregación es elevado (Bieri et al., 2019); 2) la mutación afecta a la diferenciación de las neuronas (Bahnassawy et al., 2013) y al normal desarrollo y crecimiento neuronal (crecimiento reducido de neuritas y dinámica del calcio alterada) (Korecka et al., 2019); 3) interfiere con el transporte de vesículas axonales; 4) el sistema de autofagia se encuentra desregulado (Nguyen & Krainc, 2018); 5) se originan cambios en la función y la morfología de las mitocondrias (Walter et al., 2019); 6) se ve alterada la actividad serina/treonina quinasa de LRRK2 en la endocitosis de las vesículas sinápticas (Pan et al., 2017). Es necesario señalar también que la proteína LRRK2 juega un papel en la inmunidad innata por lo que se expresa mucho en células inmunes como macrófagos y microglia. Por lo tanto, la mutación en este gen altera la función inmunológica (H. Lee et al., 2017). En última instancia, tiene lugar un incremento de la apoptosis, respuesta elevada al estrés oxidativo y mayor sensibilidad a la muerte celular inducida por neurotoxinas además de anormalidades nucleares (C. Ren et al., 2019).

El gen PARK2 codifica la proteína Parkin cuya función principal es regular la mitofagia, es decir, esta proteína está asociada a la degradación lisosomal de las mitocondrias dañadas. Parkin reconoce una proteína diana para el reclutamiento de E2 y media la transferencia de ubiquitina para la degradación proteasómica de la proteína diana (Raza et al., 2019). Actúa en conjunto con la proteína mitocondrial PINK1, que es un producto de otro gen de la EP. El efecto sinérgico de PINK1 y Parkin es importante para mantener la homeostasis celular y la calidad mitocondrial en las neuronas DA. La mitocondria disfuncional se despolariza, estabilizando PINK1; este último recluta Parkin del citosol y lo activa durante su entrega a la mitocondria, usando la actividad PINK1-quinasa; luego, Parkin ya activada, inicia la autofagia selectiva del orgánulo dañado (Konovalova et al., 2015). La sobreexpresión de Parkin podría rescatar en gran medida los defectos en mutantes PINK1 a través de la translocación mitocondrial. Las neuronas DA derivadas de iPSC mutantes de PINK1 o Parkin muestran fenotipos anormales como el deterioro de la mitofagia y la autofagia lisosomal, la vulnerabilidad a diversos estreses, el aumento del estrés oxidativo mitocondrial, una mayor liberación de dopamina (Imaizumi et al., 2012; Pickrell & Youle, 2015; Y. Ren et al., 2015). Estos hallazgos apoyan el efecto sinérgico de PINK1 y Parkin, proporcionando una inspiración para desarrollar estrategias terapéuticas para la EP.

El gen PARK7 codifica la proteína DJ-1 cuya función es proteger las células del estrés oxidativo. Varias mutaciones sin sentido en DJ-1, incluidas L166P, M26I, L10P y P158D, irrumpen la formación de homodímeros de DJ-1, lo que provoca un plegamiento deficiente y degradación de la proteína (Y. Li et al., 2020).

Las últimas mutaciones relacionadas con la EP autosómica dominante son las implicadas con el gen que codifica la VPS35. Es el componente principal del complejo retrómero, se localiza en las espinas dendríticas y es fundamental para el tráfico vesicular de endosoma-trans-golgi y el reciclaje de proteínas de membrana (Vilariño-Güell et al., 2011). En un estudio donde se utilizó un modelo de neuronas DA generadas a partir de iPSC que provenían de pacientes con el gen que codificaba para VPS35 mutado, se observó una alteración en el tráfico de receptores del neurotransmisor glutamato de tipo AMPA en la sinapsis. Esta alteración de la función sináptica puede producir estrés fisiopatológico en el circuito neuronal (Munsie et al., 2015).

Aunque hay estudios que respaldan el tipo de herencia familiar de las mutaciones del gen GBA, la mayoría se asocian con un mayor riesgo de EP esporádica. Varios estudios sobre neuronas DA derivadas de iPSC específicas del paciente que albergan mutaciones en GBA, han indicado que la β -glucosidasa tiene una alta correlación con niveles elevados de α -sinucleína, así como con defectos autofágicos y lisosomales. Además, el desequilibrio de la homeostasis del calcio y la reducción del almacenamiento y la captación de dopamina también se encuentran en las neuronas DA mutantes GBA (Aflaki et al., 2016; Schöndorf et al., 2014; Woodard et al., 2014).

5.2.2. Modelos con iPSC de EP esporádica

Hasta la fecha, los datos sobre las neuronas iPSC derivadas de pacientes con EP esporádica han estado menos disponibles con respecto a las formas hereditarias, principalmente debido a la dificultad de derivar neuronas de una gran cohorte de pacientes con EP idiopática (Ferrari et al., 2020). A continuación, se nombran algunos de los estudios que han derivado células de pacientes con EP esporádica.

Sánchez-Danés y su grupo de investigación generaron un modelo *in vitro* basado en líneas de iPSC control (sin EP) y derivadas de EP esporádicas mediante la entrega retroviral de los factores OSKM y luego las diferenciaron en neuronas DA. En el estudio compararon las neuronas DA de pacientes con EP esporádicas con el grupo control y encontraron que después de un cultivo a largo plazo mostraban algunas alteraciones morfológicas, entre ellas una mayor fragmentación caspasa 3, acortamiento de neuritas y el sistema autofagosoma defectuoso (Sánchez-Danés et al., 2012).

Fernández-Santiago y su equipo realizaron una metilación del ADN en todo el genoma y un estudio del transcriptoma en neuronas DA derivadas de iPSC generadas por la reprogramación celular de células somáticas de pacientes con EP monogénica asociada a LRRK2, EP esporádica y sujetos sanos. De este modo, estudiaron la relación entre la metilación del ADN y la alteración de la expresión génica y los elementos potenciadores. Los resultados muestran que

la metilación del ADN y la expresión del ARN eran comunes, hecho que proporciona la evidencia de que la desregulación epigenética está asociada con la EP monogénica y la esporádica (Fernández-Santiago et al., 2019; Fernández-Santiago et al., 2015). Siguiendo esta línea, se realizó un estudio encabezado por Schuze donde se analizaron las posibles diferencias en los niveles genómicos y epigenéticos y realizaron un análisis transcriptómico y epigenómico de los fibroblastos, las iPSC, las neuronas diferenciadas de los pacientes con EP esporádica y los controles. Observaron que en los fibroblastos y en las iPSC el nivel de ARNm es similar y que las neuronas diferenciadas muestran alteraciones significativas en vías involucradas en la etiología de la enfermedad, como la vía CREB y la vía que regula PGC1 α (Schulze et al., 2018).

Como se ha podido observar, en estudios donde se utilizaban neuronas DA derivadas de iPSC de pacientes con EP familiar y esporádica se manifiestan fenotipos celulares relacionados tales como el secuestro de mitocondrias en estas neuronas, el recambio de proteínas aberrantes, patrones de metilación y variaciones en la morfología, características neurodegenerativas y la expresión desregulada de algunos genes. Estas evidencias demuestran que al menos para los pacientes con EP esporádica que se modelan, la predisposición a sufrir la enfermedad está codificada genéticamente y, puede capturarse en iPSC y manifestarse como fenotipos celulares relacionados con la EP medibles en neuronas derivadas de iPSC. Las técnicas de genotipado han identificado una gran lista de loci genéticos asociados con la EP esporádica. Muchos de estos loci habían sido anteriormente vinculados a la EP familiar. Este hecho, respalda la idea de que la EP familiar y esporádica comparten hasta cierto punto su componente genético (Calatayud et al., 2017; Fernández-Santiago et al., 2019).

5.2.3. Estudio del envejecimiento y la EP

El envejecimiento es el principal factor de riesgo en el desarrollo de la EP esporádica. Con el uso de neuronas DA derivadas de las iPSC mediante el método de reprogramación resulta complejo modelar una enfermedad que es generalmente de inicio tardío, lo que representa un obstáculo importante para modelar la EP. El envejecimiento induce muchos cambios en estas neuronas; como la acumulación de neuromelanina, la degradación defectuosa de proteínas, la acumulación de mutaciones en la metilación del ADN y la acumulación de hierro. En consecuencia, examinar los efectos de estos cambios es importante para comprender la EP. Han sugerido varias soluciones para abordar el problema de modelar el envejecimiento *in vitro*.

Inicialmente, se empleaban neurotoxinas para inducir parkinsonismo en los seres humanos y los animales como 6-OHDA, MPTP, rotenona y paraquat, para modelar la EP. Estudios basados en neuronas generadas de iPSC de pacientes con la EP han investigado el efecto de tales neurotoxinas en las neuronas y encontraron que la toxicidad es a menudo más alta en las que

portan una mutación relacionada con la EP que en las células de control. Si bien los desafíos de toxinas son técnicamente simples y producen fenotipos robustos, probablemente no representan las causas subyacentes de la mayoría de los casos de EP (Raza et al., 2019).

Una solución posible sería llevar a cabo la reprogramación directa (transdiferenciación) puesto que parece conservar los marcadores relacionados con la edad. Consiste en la conversión directa de células somáticas adultas en el tipo celular objetivo, en nuestro caso, las neuronas DA, sin la necesidad de pasar por un estado pluripotente intermedio (iPSC) (Fang et al., 2018). Sin embargo, en la actualidad, faltan protocolos que permitan la obtención de neuronas DA maduras auténticas mediante la reprogramación directa (Playne & Connor, 2017).

Otra solución es cultivar las células un lapso de tiempo más largo, lo que requiere el cultivo conjunto con astrocitos. Un cultivo más prolongado puede inducir condiciones de estrés que imitan el envejecimiento *in vivo* en pacientes con EP y, por lo tanto, acelerar el desarrollo de fenotipos *in vitro* relacionados con la enfermedad (Sánchez-Danés et al., 2012). Los astrocitos son las células gliales más numerosas del SNC y son esenciales en el soporte estructural y metabólico de las neuronas. La disfunción de los astrocitos conduce a la patogenia de la EP, especialmente la EP familiar, donde se produce una captación anormal de glutamato, disfunción mitocondrial, deterioro de la autofagia y respuesta inflamatoria (Booth et al., 2017). La razón por la que se utilizan los astrocitos como sistema de cocultivo, es porque varios estudios han demostrado que contribuyen positivamente a la maduración neuronal (Gunhanlar et al., 2017; H. Li et al., 2018). Utilizando este sistema como modelo celular para estudiar la EP, se observa que los astrocitos protegen las neuronas DA con alteración de la cadena respiratoria mitocondrial y, además, son capaces de restaurar por completo la función mitocondrial. Estos resultados sugieren la importancia de la astrogliosis en el mantenimiento del desarrollo mitocondrial y la bioenergética durante la diferenciación de neuronas DA derivadas de iPSC (Du et al., 2018).

Otro modo de inducir el envejecimiento es mediante la expresión de la progerina, una forma truncada de lamina A, que es la responsable del envejecimiento prematuro. La sobreexpresión en neuronas DA derivadas de iPSC produce fenotipos de la enfermedad tales como una reducción en la longitud de la dendrita, aumento de las especies de oxígeno reactivas mitocondriales y alteraciones en la expresión de genes relacionados con el envejecimiento. La presencia de mutaciones relacionadas con la EP parece provocar que las células fueran más susceptibles al envejecimiento inducido por la progerina (Miller et al., 2013).

5.2.4. Técnicas de edición de las células iPSC

El estudio de las iPSC derivadas de pacientes con EP es complicado debido a la variabilidad en los antecedentes genéticos. La comparación entre el paciente y las células derivadas del control puede revelar diferencias específicas de la enfermedad, sin embargo, es difícil distinguirlas de las diferencias que se deben únicamente a la variación genética que no está relacionada con la enfermedad. Existen dos formas de abordar este problema. La primera es estudiar un número suficiente de pacientes y controles para que las diferencias específicas de la enfermedad sean mayores que el "ruido" genético subyacente. La segunda forma de abordar el problema es trabajar con líneas celulares isogénicas, un enfoque prometedor que ha sido facilitado por el reciente advenimiento de las tecnologías de edición del genoma (Das et al., 2020).

Las tecnologías de edición del genoma permiten la introducción de cambios genéticos en las iPSC de una manera específica, permite introducir mutaciones que causan la EP en las iPSC de WT (Wild Type) y eliminar dichas mutaciones en las iPSC de los pacientes para crear controles isogénicos. La generación de líneas de iPSC isogénicas genéticamente emparejadas con la mutación introducida como única variable, garantiza la identificación de la alteración patológica característica de la EP y evita que el trasfondo genético o epifenómeno resultante de posibles variaciones de línea a línea pueda interferir en su identificación. Los controles isogénicos de iPSC serán importantes al modelar la EP, especialmente la EP esporádica.

El desarrollo de nucleasas específicas de sitio programables, incluida la nucleasa de dedos de zinc (ZFN), nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN) y el sistema CRISPR/Cas9 ha mejorado la eficiencia de edición de genes en las ESC y las iPSC humanas al inducir roturas de doble cadena del ADN en el sitio de la modificación del gen. En particular, la tecnología CRISPR/Cas9 debido a su simplicidad en el diseño y facilidad de uso, ha ganado un amplio uso en la edición de genes de ESC e iPSC humanos (Cota-Coronado et al., 2017).

5.3. Test de agentes terapéuticos en neuronas DA derivadas de iPSCs

El objetivo de los modelos de la EP basados en las iPSC además de conocer la patología y los fenotipos de la enfermedad, es detectar posibles medicamentos y identificar nuevas dianas terapéuticas capaces de actuar sobre el proceso neurodegenerativo. Las iPSC permiten una detección más rápida de estos agentes terapéuticos, sin efectos secundarios y sin la necesidad de emplear animales en el ámbito de la investigación. Las diferencias genéticas, tanto de individuos como de subpoblaciones mutantes, facilitan los efectos de la captación de fármacos y la respuesta al tratamiento de la EP, contribuyendo significativamente a la respuesta individual a los fármacos testados y ayudando al diseño de terapias personalizadas (Stoddard-Bennett & Pera, 2020).

El cribado de drogas en neuronas derivadas de iPSC podría implementarse de dos maneras. Primero, los candidatos a fármacos podrían probarse *in vitro* en las neuronas derivadas de iPSC generadas a partir del paciente que necesita el medicamento. Aunque esta opción resulta atractiva para el individuo, conlleva mucho tiempo y puede que no sea asequible en un futuro próximo. La otra forma es probar los fármacos en neuronas derivadas de iPSC con diferentes genotipos de EP. Con las variantes genéticas que provocan la EP identificadas (obtenidas por los GWAS) y el rápido desarrollo de la secuenciación del genoma, se obtiene la información del genoma del paciente y se puede categorizar al paciente en un cierto grupo definido por su genotipo relacionado con la EP. Si podemos completar la detección de medicamentos entre estos subgrupos, una lista de medicamentos personalizados adecuados para el genotipo del paciente puede estar lista una vez que se diagnostica la enfermedad (Xiao et al., 2016).

Se utilizaron las neuronas derivadas de iPSC para evaluar la eficacia de moléculas pequeñas que inhiben la toxicidad de la α -sinucleína en un modelo de levadura. En las neuronas corticales derivadas de pacientes con EP familiares con la mutación A53T en SNCA, se probaron dos compuestos identificados para suprimir la toxicidad de la α -sinucleína en levadura: la ubiquitina ligasa Nedd4 y su activador químico NAB2. Estos compuestos revierten algunos de los fenotipos patológicos de las neuronas de la EP como: las formas inmaduras de la β -glucosidasa, los niveles elevados de NO (estrés nitrosativo) y proteínas de nicastrina, abriendo la puerta a un nuevo tratamiento farmacológico potencial (Chung et al., 2013; Torrent et al., 2015).

Por otro lado, se puede realizar un análisis transcriptómico de las neuronas DA derivadas de iPSC para descifrar los cambios de expresión génica impulsados por la variante N370S (mutación más común) en el gen de la GBA que contribuye a la EP. Los análisis revelaron un eje desregulado, desencadenado por la mala localización nuclear de la HDAC4 (histona desacetilasa 4) que conduce progresivamente al estrés del retículo endoplásmico (RE). En el tratamiento de las neuronas DA, se probaron diferentes compuestos farmacológicos, capaces de modular la localización y la actividad de HDAC4 en estas. Demostraron ser eficaces para rescatar la mayoría de las anomalías celulares de las neuronas GBA-N370S, por lo que HDAC4 destacaría como posible objetivo novedoso en el tratamiento de la EP (Lang et al., 2019).

La vía MEF2C-PGC1 α puede ser otro objetivo terapéutico interesante para combatir la EP de aparición tardía bajo interacciones genéticas ambientales (C. Ren et al., 2019). Un estudio con iPSC derivadas de pacientes con EP descubrió que el estrés nitrosativo/oxidativo causa disfunción mitocondrial y muerte neuronal en neuronas DA que contienen la mutación A53T para α -sinucleína mediante la S-nitrosilación del factor de transcripción MEF2C. El isoxazol podría

emplearse como fármaco, ya que además de impulsar la expresión tanto de MEF2 como de PGC1 α , protege a las neuronas DA de la apoptosis inducida por pesticidas (Xiao et al., 2016).

Por otra parte, se ha demostrado que la rapamicina, la coenzima Q10 y el GW5074 (un inhibidor de la quinasa LRRK2) rescatan la citotoxicidad causada por valinomicina o concanamicina A en neuronas derivadas de iPSC de pacientes con EP (C. Ren et al., 2019). Además, el hallazgo de que la rapamicina y GW5074 redujeron selectivamente la producción de especies reactivas de oxígeno en las neuronas mutadas en PINK1 derivadas de iPSC pero no en células neurales de sujetos sanos, destaca la diferencia en la susceptibilidad a compuestos farmacéuticos entre neuronas enfermas y modelos de enfermedades artificiales (Xiao et al., 2016).

5.4. Terapia celular

Con la neurodegeneración relativamente localizada, la EP también es un buen candidato para la terapia celular. Las iPSC se están empleando como estrategia para el remplazo celular que tienen como objetivo restaurar la vía nigroestriatal completa. Para que pueda llevarse a cabo con éxito se deben considerar los siguientes aspectos claves: la fuente celular, la ubicación del trasplante y la estrategia para facilitar el crecimiento axonal suficiente y apropiado hacia el cuerpo estriado.

5.4.1. Fuente celular

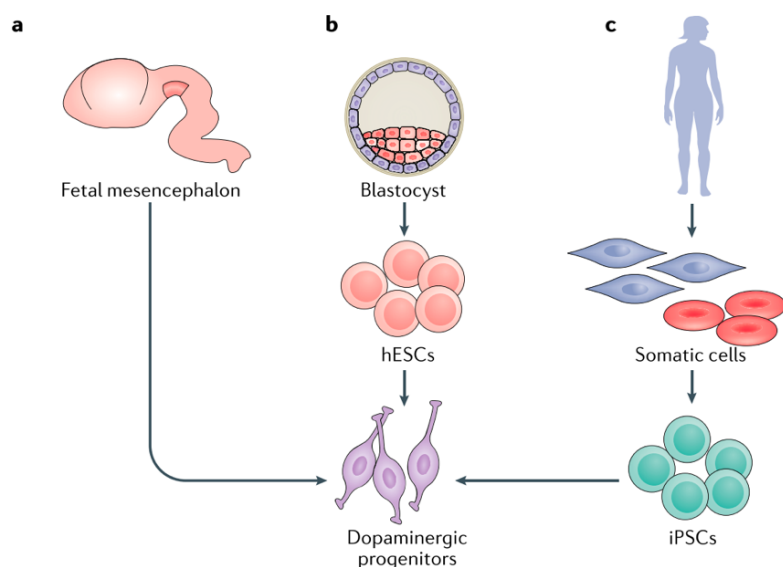


Ilustración 3. Fuentes celulares para la terapia de reemplazo celular en la EP (Parmar et al., 2020).

Los estudios preclínicos en roedores han demostrado que los injertos fetales trasplantados pueden inervar el cuerpo estriado de dopamina, recibir impulsos en las neuronas del huésped y disminuir los síntomas motores (Barker et al., 2013). En 1989 se implantó tejido mesencefálico ventral embrionario en un paciente con la EP de 59 años y las neuronas DA trasplantadas mostraron supervivencia celular y una correcta función de estas y de sus circuitos cerebrales incluso 24 años después

del trasplante (Hallett et al., 2014; W. Li et al., 2016). No obstante, en múltiples ensayos clínicos, cerca del 15% de los pacientes desarrollaron discinesia inducida por injerto (GID). La GID es un efecto adverso probablemente causado por la liberación descontrolada de dopamina y el

crecimiento excesivo del injerto embrionario y a diferencia de la discinesia típica provocada por el tratamiento con L-DOPA (LID) en pacientes con EP, los movimientos motores anormales inducidos por GID no se resuelven con el reajuste del tratamiento de L-DOPA (Harris et al., 2020). A pesar de los éxitos nombrados y el potencial del empleo de los injertos fetales como estrategia de trasplante, esta fuente celular acarrea una serie de preocupaciones éticas y disponibilidad de tejido (Barker et al., 2017). Por esta razón, es necesario emplear otro candidato celular capaz de generar neuronas DA semejantes a las que se encuentran en la SNpc y que sean capaces de reestablecer la innervación estriatal (Barker et al., 2015). Dentro de este grupo encontramos las ESCs y las iPSCs.

Algunos estudios han demostrado la supervivencia de neuronas DA derivadas de las ESC en el cerebro de roedores adultos (Grealish et al., 2014; Kriks et al., 2011). El uso de esta fuente celular tiene un mayor riesgo de formación de tumores a causa de la diferenciación incompleta. Además, el uso de ESC se encuentra limitado debido a las mismas limitaciones que conllevaban los trasplantes fetales (las preocupaciones éticas y la falta de disponibilidad de tejidos). Sin embargo, las neuronas DA derivadas de las iPSC como estrategia para trasplantes celulares en la EP resultan prometedoras, puesto que se generan a partir de cualquier célula somática. La primera ventaja con respecto a los injertos fetales y al uso de las ESC es que pueden establecerse sin el sacrificio de embriones humanos. Otra ventaja es que se ha reducido el riesgo de tumorigenicidad gracias a la optimización de los protocolos de diferenciación (Doi et al., 2020; Zygogianni et al., 2019).

5.4.2. Ubicación del trasplante y estrategia de innervación axonal

El siguiente aspecto a considerar para desarrollar una estrategia regenerativa exitosa es la ubicación del injerto. El injerto de las iPSC podría situarse en el cuerpo estriado, en la SNpc o bien, a lo largo de toda la longitud de la vía nigroestriatal.

En la mayoría de los estudios, las células trasplantadas se han colocado dentro del sitio objetivo, el cuerpo estriado, y no dentro del sitio lesionado, la SNpc, ya que se pensaba que la vía nigroestriatal adulta constituía un entorno no permisivo para el crecimiento axonal a larga distancia (Gaillard & Jaber, 2011). No obstante, la ubicación ideal es probablemente la SNpc, puesto que es donde se encuentran las neuronas DA que proporcionan información al cuerpo estriado. A pesar de que varios estudios han demostrado la funcionalidad de las neuronas DA derivadas de fuentes celulares pluripotentes cuando se injertan en el cuerpo estriado de modelos de EP de roedores y primates no humanos, quedan varias preguntas con respecto a su potencial de crecimiento axonal y su capacidad para integrarse en los circuitos del anfitrión (Harris et al., 2020). La comprensión de cómo se integran las neuronas del injerto con los circuitos del

huésped es importante para el diseño de terapias clínicas de reemplazo basadas en células madre para la EP (Adler et al., 2019).

En 2018 se llevó a cabo un estudio que consistía en el trasplante de progenitores neurales derivados de ESC humanas con patrón de VM en el mesencéfalo de ratas lesionadas con 6-OHDA. Los resultados demostraron que las neuronas injertadas tienen la capacidad de extender las proyecciones axonales hacia las estructuras diana del prosencéfalo y, que además, se integran con los circuitos del hospedador 6 semanas después del trasplante, de una manera que es comparable con la conectividad endógena del mesencéfalo (Cardoso et al., 2018). Más tarde, en un estudio encabezado por el mismo autor dilucidaron los factores que controlan la innervación y la integración de los circuitos del injerto después del trasplante en un modelo de rata preclínica con el fin de optimizar la reinervación estriatal (Adler et al., 2019). En la línea para mejorar la reinervación estriatal se encuentra un estudio en el cual inyectaban ácido kaínico (un aminoácido excitador) en el tejido mesencefálico fetal injertado entre la SNpc y el cuerpo estriado para crear un entorno trófico para el crecimiento axonal (Weng et al., 2017).

Varios grupos de investigación han establecido protocolos de cultivo que inducen neuronas DA del cerebro medio de las iPSC humanas, y se ha demostrado que son seguras y efectivas en modelos de roedores y primate con la EP. Sin embargo, el uso de iPSC para terapias basadas en células es un desafío tan nuevo que las reglas reguladoras no están estandarizadas universalmente. De hecho, cada país tiene sus propias normativas y diferentes criterios de aplicación clínica. Por lo tanto, para desarrollar una terapia celular estándar global para la EP, es importante compartir los resultados de los estudios preclínicos y los resultados de los ensayos clínicos. Actualmente, se están realizando dos ensayos clínicos que utilizan ESC humanas en Australia (NCT02452723) y China (NCT03119636), y se informa de sus estudios preclínicos. Se ha empezado un ensayo clínico (UMIN000033564) en Japón para tratar a pacientes con EP mediante el uso de progenitores dopaminérgicos derivados de iPSC (DAP) del cual se hablará más adelante. Debido a que en estas terapias las células injertadas sobreviven y funcionan como neuronas DA durante mucho tiempo (posiblemente hasta que el paciente muere), deben someterse a una gestión de riesgos más intensiva en comparación con otros ensayos clínicos que utilizan células madre mesenquimales, en los que las células injertadas funcionan para proporcionar soporte neurotrófico o inmunomodulador, pero no como neuronas DA, y no sobreviven mucho tiempo (Doi et al., 2020).

5.4.3. Seguridad en la generación de las neuronas DA para el trasplante celular

Para poder comenzar con las aplicaciones clínicas se deben considerar algunos aspectos asociados con la terapia basada en iPSC. Uno de estos aspectos es el riesgo de

tumorigenicidad, ya que las células pluripotentes se mantienen en cultivo durante períodos prolongados de tiempo y pueden acumular anomalías cariotípicas, variantes en el número de copias y pérdida de heterozigosidad. Por lo tanto, antes del uso clínico, los productos derivados de iPSC deben examinarse cuidadosamente para detectar la ausencia de alteraciones genéticas, evaluar la variabilidad y el estado de diferenciación y probarse rigurosamente para garantizar su pureza, calidad y esterilidad (Doi et al., 2020; Stoddard-Bennett & Pera, 2020; Zheng & Chen, 2019).

Aunque no se ha demostrado que los productos diferenciados de las iPSC confieran un riesgo considerable de crecimiento neoplásico y formación de teratomas, es fundamental garantizar que el producto final no contenga células indiferenciadas que tengan el potencial de generar teratomas, con lo cual, se necesitan protocolos mejorados para diferenciar las iPSC humanas en neuronas DA. Para conseguirlo, se han identificado moléculas inhibitorias que han demostrado inducir la muerte celular selectiva y completa de las iPSC humanas indiferenciadas sin afectar a las neuronas DA diferenciadas (M. O. Lee et al., 2013). Por otro lado, se puede analizar la expresión de los marcadores de las células: para neuronas DA progenitoras (FOXA2 y TUJ1), iPSC (OCT3 / 4 = POU5F1, LIN28 y TRA-2-49) y progenitores neurales tempranos proliferantes (SOX1, PAX6 y KI67) por citometría de flujo y PCR cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR). También se utiliza la inmunotinción para ver qué células expresan el marcador CORIN+ usando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) (Doi et al., 2020). En la etapa temprana de diferenciación, puede haber células SOX1 + PAX6 + (estas células forman rosetas y proliferan en el cerebro). Sin embargo, la expresión de CORIN nunca es común con la expresión de SOX1 y PAX6. Por lo tanto, podemos eliminar las células SOX1+ PAX6+ clasificando las células CORIN+ y de este modo evitar que las iPSC indiferenciadas o las células madre neurales pasen a la siguiente fase del proceso (Doi et al., 2020; Kikuchi et al., 2017; J. Takahashi, 2019).

Para monitorear la supervivencia celular a largo plazo, la restauración de la función motora, la funcionalidad (para ver si las neuronas DA injertadas sintetizaban dopamina correctamente), la proliferación y para confirmar la seguridad de las células injertadas se utilizan técnicas de imagen como las de resonancia magnética nuclear (MRI) y tomografía por emisión de positrones (PET) (Grealish et al., 2014; Kikuchi et al., 2017). Para evaluar la producción de dopamina, se puede medir la liberación de dopamina mediante cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS / MS) en respuesta a una estimulación alta de KCl (Doi et al., 2020).

Los resultados mediante las técnicas mencionadas verifican que no hay componentes tumorigénicos en las neuronas DA obtenidas. No obstante, los cambios genómicos y

epigenéticos en las células pueden afectar el comportamiento celular después del trasplante. Para examinar esta posibilidad, se comparan los resultados de la secuenciación del genoma completo (WGS) y secuenciación del exoma completo (WES) obtenida de células somáticas, iPSC indiferenciadas y células diferenciadas (neuronas DA). Existen diferentes catálogos, listas y bases de datos de mutaciones genéticas a las que se puede recurrir para poder llevar a cabo las comparaciones (COSMIC, HGMD, Shibata). Para examinar la variación de las expresiones génicas se realiza un análisis RT-qPCR (Doi et al., 2020).

Finalmente, una vez se haya aprobado por el comité de ética, los productos utilizados para los análisis genómicos y epigenéticos se prueban en modelos animales. Este es el último paso para estudiar la tumorigenicidad y examinar la toxicidad y la biodistribución de las células (Doi et al., 2020; Shi et al., 2017). Después del trasplante, los modelos animales se sacrifican y se obtiene un trozo de injerto, una sección del cual se utiliza para la tinción hematoxilina-eosina (H-E), y las otras secciones para inmunohistoquímica con anticuerpos anti-TH, anti-KU80, anti-KI67, anti-citoqueratina y anti-TT. La tinción con H-E permite observar si los injertos presentaban formación de rosetas o hallazgos malignos como pleomorfismo. La inmunotinción con doble o triple marcaje sirve para visualizar la expresión de los marcadores utilizando un microscopio de fluorescencia y un microscopio confocal (Barker et al., 2017; Doi et al., 2020; Kikuchi et al., 2017).

5.4.4. Selección del paciente adecuado para el trasplante

La elección de los pacientes para el trasplante, no es sencilla. Primero, los pacientes necesitan demostrar una respuesta clara a los medicamentos con DA orales. En cuanto a decidir en qué momento de la EP deberían tratarse con la terapia celular, existen diferentes puntos de vista. Algunos investigadores argumentan que la cohorte ideal para el trasplante debería reclutar a los pacientes que tienen más probabilidades de obtener el máximo beneficio, es decir, pacientes más jóvenes con enfermedad menos avanzada, sin discinesias inducidas por L-DOPA (LID), sin déficits cognitivos y una buena respuesta a los medicamentos dopaminérgicos. Sin embargo, otros argumentarán que en esta etapa de su enfermedad no es ético y que, en cambio, el tratamiento (terapia celular) debe probarse en pacientes con enfermedad más avanzada, puesto que se encuentran en una etapa de su enfermedad en la que se necesita un enfoque terapéutico más invasivo. Además, resultará más fácil monitorear la eficacia en este último grupo de pacientes en comparación con los pacientes con enfermedad más leve donde las respuestas a las terapias con medicamentos son eficaces. Por el momento, la mayoría de los grupos-estudio eligen a pacientes con una enfermedad un poco más avanzada, pero no tan avanzada como para tener un LID significativo (Barker et al., 2017).

5.4.5. Respuesta inmune en el trasplante según el origen de las iPSC

Otra cuestión importante es determinar la procedencia del injerto de iPSC, si es específico del propio paciente (autólogo) o de un donante compatible con HLA (alógeno). Los injertos de iPSC específicos para el paciente limitarían la variabilidad de respuesta observada en ensayos clínicos anteriores que utilizan fuentes celulares de terceros y además se evitarían los efectos secundarios graves asociados con la inmunosupresión necesaria a largo plazo para preservar las células alogénicas. Aunque las neuronas derivadas del paciente tienen la mejor compatibilidad inmunológica para el trasplante, hay cuestiones a tener en cuenta para el autotrasplante. En primer lugar, si no se corrigen los defectos genéticos, el trasplante de neuronas DA derivadas de iPSC predispondría al paciente a la neurodegeneración. Actualmente se pueden corregir las variaciones relacionadas con la EP en los genes mediante las técnicas de edición del genoma explicadas en el apartado del modelado de la enfermedad. No obstante, la rectificación completa de estas variaciones sigue siendo poco práctica, ya que es el efecto acumulativo de docenas de variaciones que conducen a la EP. Por el contrario, sería mucho más económico y práctico si el paciente fuera tratado con un injerto de neuronas compatible con HLA (Xiao et al., 2016). Para facilitar el trasplante alogénico y evitar el rechazo celular, será necesario mejorar la eficacia de los protocolos inmunosupresores convencionales y los bloqueadores coestimuladores para inducir inmunotolerancia en entornos preclínicos y clínicos. Hasta la fecha, todos los estudios clínicos han incluido un tratamiento inmunosupresor, excepto el ensayo realizado con iPSC autólogas (NCT03815071) del que aún no se conocen resultados. Desafortunadamente, todavía existe una alta variabilidad en la tasa de recuperación en los estudios realizados con los precursores dopaminérgicos derivados de ESC y iPSC. Hoy en día, las iPSC autólogas derivadas de pacientes con EP genética no se pueden utilizar (Díaz, 2019).

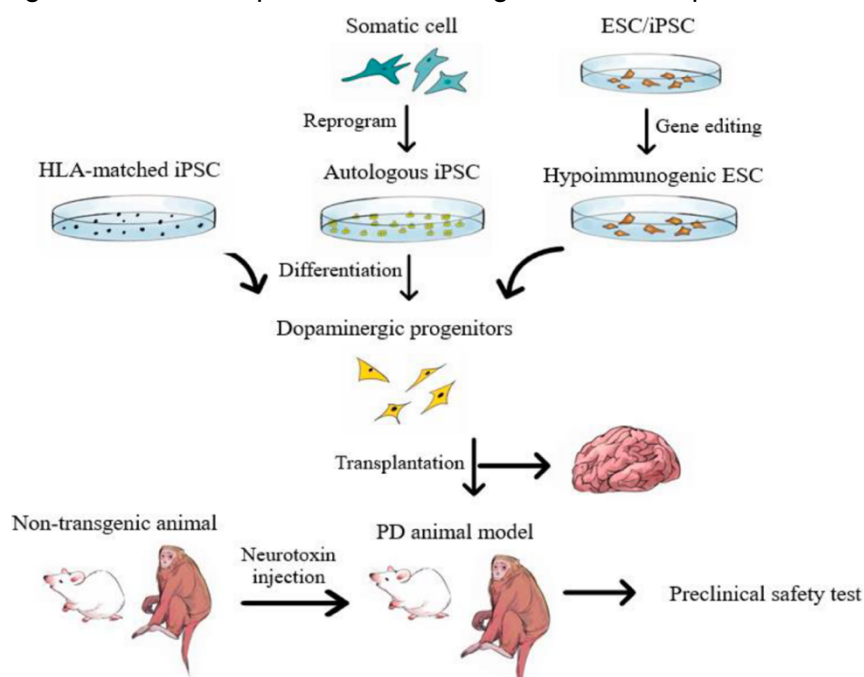


Ilustración 4. Terapia celular para la enfermedad del Parkinson (Liu & Cheung, 2020).

En Japón, los investigadores estiman que 50 líneas de iPSC de donantes HLA-homocigóticos cubrirán el 73% de la población japonesa haciendo coincidir tres loci HLA (A, B y DR). La reprogramación de iPSC puede suponer un procedimiento largo y un coste alto para el paciente, pero el rechazo inmune reducido y las líneas genéricas de donantes podrían reducir significativamente los costes cuando se amplía la escala. Además, las coincidencias de HLA de los injertos alogénicos reducen las dosis de inmunosupresores después de la operación (Stoddard-Bennett & Reijo Pera, 2019). Los estudios realizados en primates del injerto de iPSC, como ya se ha comentado anteriormente, han demostrado mejoras significativas y un aumento de la supervivencia celular, así como una respuesta menor de microglía y leucocitos cuando son histocompatibles (Kikuchi et al., 2017). La principal diferencia entre los estudios en primates y humanos será el tratamiento de pacientes con EP reales en lugar de los modelos de primates inducidos químicamente.

5.4.6. Primer trasplante humano con neuronas DA derivadas de iPSC

En 2018 empezó el primer ensayo clínico (UMIN0000335641) para tratar la EP en humanos en el Hospital Universitario de Kyoto mediante el trasplante de neuronas DA generadas a partir de un stock de células iPCS para medicina regenerativa procedentes CiRA (*Center for iPS Cell Research and Application*). La fuente celular de iPSC fue generada a partir de células sanguíneas de donantes de terceros con loci HLA coincidentes (trasplante alogénico) para garantizar la integridad y eliminar la interferencia genética de los pacientes. No obstante, recibirán un inmunosupresor estándar (*Tacrolimus*) debido a la naturaleza exploratoria del ensayo. Antes del ensayo clínico, la calidad de las iPSC de grado clínico y sus derivados fueron evaluados realizando pruebas de seguridad (que incluyen toxicidad, tumorigenicidad, distribución y estabilidad genómica) en una agencia reguladora japonesa (*Pharmaceutical and Medical Devices Agency*) y se confirmó la eficacia de las células de grado clínico en modelos de ratas tratadas con 6-OHDA (Doi et al., 2020). Como los resultados en estas pruebas fueron exitosos, se procedió al trasplante en humanos. El procedimiento consistía en administrar cerca de 5 millones de células DA a la SNpc mediante cirugía cerebral estereotáxica en los lados derecho e izquierdo del putamen del paciente. Siete pacientes con EP moderada de entre 50-70 años que cumplían los criterios inclusivos para la terapia celular fueron seleccionados y la progresión de la enfermedad y los posibles efectos secundarios serán supervisados durante los dos años posteriores a la cirugía.

6. Discusión y conclusiones

Las iPSC derivadas de pacientes con la EP se han estado estudiando durante casi 10 años. Actualmente, además del método de reprogramación mediante los factores OSKM también se

están optimizando otros métodos de reprogramación. Además, para evitar la integración de genes exógenos en la generación de iPSC se ha adoptado estrategias tales como el método no integrativo y la reprogramación basada en proteínas o péptidos. Por último, se han optimizado los protocolos de diferenciación obteniendo neuronas DA de gran pureza y calidad, viables y funcionales.

Las iPSC ofrecen una nueva plataforma para modelar y estudiar la EP. Esta tecnología ofrece una capacidad sin precedentes para imitar la enfermedad *in vitro* con tipos de células relevantes para la enfermedad específica para cada paciente. Mediante los modelos experimentales basados en iPSC a partir de pacientes con formas genéticas e idiopáticas de EP se han recapitado las características clave de la enfermedad. La generación de estos modelos de EP ha permitido descubrir algunos de los mecanismos patogénicos cruciales responsables del inicio y de la progresión de la EP, y comprender cómo afecta el envejecimiento celular en el desarrollo de la enfermedad. También, el uso de iPSC y sus derivados neuronales en diferentes etapas de diferenciación es un enfoque prometedor para el cribado de nuevos fármacos o compuestos neuroprotectores que pueden atenuar, prevenir o rescatar la neurodegeneración en la EP. Las técnicas de edición del genoma juegan un papel muy importante para el control de la variación genética, ya que permiten la introducción de una mutación patogénica en una línea de control o la corrección de una mutación en una línea de paciente. El desarrollo de la tecnología CRISPR ha facilitado enormemente la generación de líneas iPSC isogénicas, es decir, líneas que tienen el mismo trasfondo genético, diferenciándose solo en la mutación de interés facilitando de este modo el modelado de la enfermedad.

Por otro lado, las iPSC humanas presentan un medio novedoso para el reemplazo celular en aplicaciones clínicas. Se prevé que el trasplante de precursores de neuronas DA derivadas de iPSC al cuerpo estriado, generará resultados más sólidos y consistentes que las terapias regenerativas probadas anteriormente que utilizan tejido VM fetal. Además, el uso de las iPSC en la terapia celular reemplaza el uso controvertido de las ESC humanas. La amenaza de la tumorigenicidad, parece estar bien controlada y los protocolos para la obtención de precursores dopaminérgicos están bien establecidos y caracterizados, dando lugar a un gran número de neuronas DA clínicamente relevantes según las pautas de GMP.

Otra ventaja que presentan las neuronas DA generadas a partir de células somáticas mediante reprogramación, es que son seguras contra el rechazo inmunológico. De hecho, algunos aspectos que deben mejorarse son el desarrollo de métodos quirúrgicos para el trasplante celular, considerando los procesos inflamatorios e inmunológicos sobre la progresión de la EP y las células implantadas, la selección de pacientes para ensayos clínicos y su seguimiento, la

selección de los tipos de células para el trasplante y la planificación de los ensayos clínicos. Los resultados del ensayo de Fase I / II realizado por el CiRA de la Universidad de Kyoto serían importantes porque representa el primer ensayo en humanos que utiliza células neuronales derivadas iPSC.

En cuanto a perspectivas futuras, un descubrimiento clave en los últimos años no solo ha sido la generación de neuronas DA a partir de iPSC humanas, sino también el desarrollo de un método para su diferenciación en grandes estructuras multicelulares similares a organoides 3D que expresan marcadores característicos del mesencéfalo humano. Las neuronas DA, cuando se cultivan en un sustrato 2D (bidimensional), se comportan diferente estructuralmente y funcionalmente que cuando se cultivan en cultivos 3D (tridimensionales). Los sistemas de cultivo más complejos contribuirán al progreso en el modelaje de la EP, ya que reflejan con mayor fidelidad lo que ocurre *in vivo*, obteniendo modelos más precisos de los circuitos neuronales y la organización fisiológica del cerebro. Actualmente, se están llevando a cabo investigaciones para generar organoides 3D similares al mesencéfalo humano que contienen neuronas DA del mesencéfalo eléctricamente activas y funcionalmente maduras y modelos de barrera hematoencefálica *in vitro* para que se asemejen mejor a una matriz extracelular *in vivo*. Los avances en los dispositivos de microfluidos y la impresión 3D con biomateriales compatibles también representan vías futuras de investigación para modelar circuitos neuronales complejos. En consecuencia, el rápido desarrollo de este enfoque ofrece la posibilidad de un progreso clave en la evaluación de enfoques terapéuticos en modelos más fisiológicamente relevantes que abren nuevas perspectivas también para enfoques futuros en el descubrimiento de fármacos (Ferrari et al., 2020; Jamebozorgi et al., 2019).

7. Bibliografía

- Adler, A. F., Cardoso, T., Nolbrant, S., Mattsson, B., Hoban, D. B., Jarl, U., Wahlestedt, J. N., Grealish, S., Björklund, A., & Parmar, M. (2019). hESC-Derived Dopaminergic Transplants Integrate into Basal Ganglia Circuitry in a Preclinical Model of Parkinson's Disease. *Cell Reports*, 28(13), 3462-3473.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.058>
- Aflaki, E., Borger, D. K., Moaven, N., Stubblefield, B. K., Rogers, S. A., Patnaik, S., Schoenen, F. J., Westbroek, W., Zheng, W., Sullivan, P., Fujiwara, H., Sidhu, R., Khaliq, Z. M., Lopez, G. J., Goldstein, D. S., Ory, D. S., Marugan, J., & Sidransky, E. (2016). A new glucocerebrosidase chaperone reduces α -synuclein and glycolipid levels in iPSC-derived dopaminergic neurons from patients with Gaucher disease and parkinsonism. *Journal of Neuroscience*, 36(28), 7441–7452. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0636-16.2016>
- Amin, N., Tan, X., Ren, Q., Zhu, N., & Botchway, B. O. A. (2019). Recent advances of induced pluripotent stem cells application in neurodegenerative diseases. In *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* (Vol. 95, p. 109674). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109674>

- Bahnassawy, L., Nicklas, S., Palm, T., Menzl, I., Birzele, F., Gillardon, F., & Schwamborn, J. C. (2013). The Parkinson's disease-associated LRRK2 mutation R1441G inhibits neuronal differentiation of neural stem cells. *Stem Cells and Development*, 22(18), 2487–2496. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0163>
- Barker, R. A., Barrett, J., Mason, S. L., & Björklund, A. (2013). Fetal dopaminergic transplantation trials and the future of neural grafting in Parkinson's disease. In *The Lancet Neurology* (Vol. 12, Issue 1, pp. 84–91). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70295-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70295-8)
- Barker, R. A., Drouin-Ouellet, J., & Parmar, M. (2015). Cell-based therapies for Parkinson disease-past insights and future potential. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 11, Issue 9, pp. 492–503). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.123>
- Barker, R. A., Parmar, M., Studer, L., & Takahashi, J. (2017). Human Trials of Stem Cell-Derived Dopamine Neurons for Parkinson's Disease: Dawn of a New Era. In *Stem Cell* (Vol. 21, Issue 5, pp. 569–573). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.09.014>
- Bieri, G., Brahic, M., Bousset, L., Couthouis, J., Kramer, N. J., Ma, R., Nakayama, L., Monbureau, M., Defensor, E., Schüle, B., Shamloo, M., Melki, R., & Gitler, A. D. (2019). LRRK2 modifies α -syn pathology and spread in mouse models and human neurons. *Acta Neuropathologica*, 137(6), 961–980. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-01995-0>
- Booth, H. D. E., Hirst, W. D., & Wade-Martins, R. (2017). The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 40, Issue 6, pp. 358–370). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.04.001>
- Byers, B., Cord, B., Nguyen, H. N., Schüle, B., Fenno, L., Lee, P. C., Deisseroth, K., Langston, J. W., Pera, R. R., & Palmer, T. D. (2011). SNCA triplication Parkinson's patient's iPSC-Derived DA neurons accumulate α -Synuclein and are susceptible to oxidative stress. *PLoS ONE*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026159>
- Cai, Y., Dai, X., Zhang, Q., & Dai, Z. (2015). Gene expression of OCT4, SOX2, KLF4 and MYC (OSKM) induced pluripotent stem cells: Identification for potential mechanisms. *Diagnostic Pathology*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13000-015-0263-7>
- Calatayud, C., Carola, G., Consiglio, A., & Raya, A. (2017). Modeling the genetic complexity of Parkinson's disease by targeted genome edition in iPS cells. *Current Opinion in Genetics & Development*, 46, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.06.002>
- Cardoso, T., Adler, A. F., Mattsson, B., Hoban, D. B., Nolbrant, S., Wahlestedt, J. N., Kirkeby, A., Grealish, S., Björklund, A., & Parmar, M. (2018). Target-specific forebrain projections and appropriate synaptic inputs of hESC-derived dopamine neurons grafted to the midbrain of parkinsonian rats. *Journal of Comparative Neurology*, 526(13), 2133–2146. <https://doi.org/10.1002/cne.24500>
- Chen, W., Huang, Q., Ma, S., & Li, M. (2019). Progress in dopaminergic cell replacement and regenerative strategies for parkinson's disease. In *ACS Chemical Neuroscience* (Vol. 10, Issue 2, pp. 839–851). American Chemical Society.

<https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00389>

- Cheng, L., Hu, W., Qiu, B., Zhao, J., Yu, Y., Guan, W., Wang, M., Yang, W., & Pei, G. (2014). Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell Research*, 24(6), 665–679. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.32>
- Chung, C. Y., Khurana, V., Auluck, P. K., Tardiff, D. F., Mazzulli, J. R., Soldner, F., Baru, V., Lou, Y., Freyzon, Y., Cho, S., Mungenast, A. E., Muffat, J., Mitalipova, M., Pluth, M. D., Jui, N. T., Schuře, B., Lippard, S. J., Tsai, L. H., Krainc, D., ... Lindquist, S. (2013). Identification and rescue of α -synuclein toxicity in Parkinson patient-derived neurons. *Science*, 342(6161), 983–987. <https://doi.org/10.1126/science.1245296>
- Cota-Coronado, J. A., Sandoval-Ávila, S., Gaytan-Dávila, Y. P., Diaz, N. F., Vega-Ruiz, B., Padilla-Camberos, E., & Díaz-Martínez, N. E. (2017). Nuevos modelos transgénicos para el estudio de la enfermedad de Parkinson basados en sistemas de edición con nucleasas. *Neurologia*, 35(7). <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2017.08.009>
- Das, D., Feuer, K., Wahbeh, M., & Avramopoulos, D. (2020). Modeling Psychiatric Disorder Biology with Stem Cells. In *Current Psychiatry Reports* (Vol. 22, Issue 5). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11920-020-01148-1>
- De Virgilio, A., Greco, A., Fabbrini, G., Inghilleri, M., Rizzo, M. I., Gallo, A., Conte, M., Rosato, C., Ciniglio Appiani, M., & de Vincentiis, M. (2016). Parkinson's disease: Autoimmunity and neuroinflammation. *Autoimmunity Reviews*, 15(10), 1005–1011. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.07.022>
- Díaz, M. L. (2019). Regenerative medicine: Could Parkinson's be the first neurodegenerative disease to be cured? In *Future Science OA* (Vol. 5, Issue 9, pp. 418–2056). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2144/fsoa-2019-0035>
- Doi, D., Magotani, H., Kikuchi, T., Ikeda, M., Hiramatsu, S., Yoshida, K., Amano, N., Nomura, M., Umekage, M., Morizane, A., & Takahashi, J. (2020). Pre-clinical study of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells for Parkinson's disease. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17165-w>
- Du, F., Yu, Q., Chen, A., Chen, D., & ShiDu Yan, S. (2018). Astrocytes Attenuate Mitochondrial Dysfunctions in Human Dopaminergic Neurons Derived from iPSC. *Stem Cell Reports*, 10(2), 366–374. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.12.021>
- Fang, L., El Wazan, L., Tan, C., Nguyen, T., Hung, S. S. C., Hewitt, A. W., & Wong, R. C. B. (2018). Potentials of cellular reprogramming as a novel strategy for neuroregeneration. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00460>
- Fasano, C. A., Chambers, S. M., Lee, G., Tomishima, M. J., & Studer, L. (2010). Efficient Derivation of Functional Floor Plate Tissue from Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 6(4), 336–347. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.03.001>
- Fernández-Santiago, R., Merkel, A., Castellano, G., Heath, S., Raya, Á., Tolosa, E., Martí, M.-J., Consiglio, A., & Ezquerro, M. (2019). Whole-genome DNA hyper-methylation in iPSC-derived dopaminergic neurons from Parkinson's disease patients. *Clinical Epigenetics*,

11(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0701-6>

- Fernández-Santiago, R., Carballo-Carbajal, I., Castellano, G., Torrent, R., Richaud, Y., Sánchez-Danés, A., Vilarrasa-Blasi, R., Sánchez-Pla, A., Mosquera, J. L., Soriano, J., López-Barneo, J., Canals, J. M., Alberch, J., Raya, Á., Vila, M., Consiglio, A., Martín-Subero, J. I., Ezquerra, M., & Tolosa, E. (2015). Aberrant epigenome in iPSC-derived dopaminergic neurons from Parkinson's disease patients. *EMBO Molecular Medicine*, 7(12), 1529–1546. <https://doi.org/10.15252/emmm.201505439>
- Ferrari, E., Cardinale, A., Picconi, B., & Gardoni, F. (2020). From cell lines to pluripotent stem cells for modelling Parkinson's Disease. In *Journal of Neuroscience Methods* (Vol. 340, p. 108741). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108741>
- Gaillard, A., & Jaber, M. (2011). Rewiring the brain with cell transplantation in Parkinson's disease. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 34, Issue 3, pp. 124–133). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.01.003>
- Grealish, S., Diguët, E., Kirkeby, A., Mattsson, B., Heuer, A., Bramoulle, Y., Van Camp, N., Perrier, A. L., Hantraye, P., Björklund, A., & Parmar, M. (2014). Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell*, 15(5), 653–665. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.017>
- Gunhanlar, N., Shpak, G., van der Kroeg, M., Gouty-Colomer, L. A., Munshi, S. T., Lendemeijer, B., Ghazvini, M., Dupont, C., Hoogendijk, W. J. G., Gribnau, J., de Vrij, F. M. S., & Kushner, S. A. (2017). A simplified protocol for differentiation of electrophysiologically mature neuronal networks from human induced pluripotent stem cells. *Molecular Psychiatry*, 23(5), 1336. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.56>
- Hallett, P. J., Cooper, O., Sadi, D., Robertson, H., Mendez, I., & Isacson, O. (2014). Long-Term Health of Dopaminergic Neuron Transplants in Parkinson's Disease Patients. *Cell Reports*, 7(6), 1755–1761. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.027>
- Harris, J. P., Burrell, J. C., Struzyna, L. A., Chen, H. I., Serruya, M. D., Wolf, J. A., Duda, J. E., & Cullen, D. K. (2020). Emerging regenerative medicine and tissue engineering strategies for Parkinson's disease. In *npj Parkinson's Disease* (Vol. 6, Issue 1). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41531-019-0105-5>
- Heman-Ackah, S. M., Manzano, R., Hoozemans, J. J. M., Scheper, W., Flynn, R., Haerty, W., Cowley, S. A., Bassett, A. R., & Wood, M. J. A. (2017). Alpha-synuclein induces the unfolded protein response in Parkinson's disease SNCA triplication iPSC-derived neurons. *Human Molecular Genetics*, 26(22), 4441–4450. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx331>
- Hu, X., Mao, C., Fan, L., Luo, H., Hu, Z., Zhang, S., Yang, Z., Zheng, H., Sun, H., Fan, Y., Yang, J., Shi, C., & Xu, Y. (2020). Modeling Parkinson's Disease Using Induced Pluripotent Stem Cells. In *Stem Cells International* (Vol. 2020). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/1061470>
- Imaizumi, Y., Okada, Y., Akamatsu, W., Koike, M., Kuzumaki, N., Hayakawa, H., Nihira, T., Kobayashi, T., Ohyama, M., Sato, S., Takanashi, M., Funayama, M., Hirayama, A., Soga,

- T., Hishiki, T., Suematsu, M., Yagi, T., Ito, D., Kosakai, A., ... Okano, H. (2012). Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and α -synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. *Molecular Brain*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/1756-6606-5-35>
- Irion, S. (2019). Cell Therapies for Parkinson's Disease. In *Clinical and Translational Science* (Vol. 12, Issue 2, pp. 95–97). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/cts.12612>
- Jamebozorgi, K., Taghizadeh, E., Rostami, D., Pormasoumi, H., Barreto, G. E., Hayat, S. M. G., & Sahebkar, A. (2019). Cellular and Molecular Aspects of Parkinson Treatment: Future Therapeutic Perspectives. *Molecular Neurobiology*, 56(7), 4799–4811. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1419-8>
- Ke, M., Chong, C. M., & Su, H. (2019). Using induced pluripotent stem cells for modeling Parkinson's disease. *World Journal of Stem Cells*, 11(9), 634–649. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i9.634>
- Kikuchi, T., Morizane, A., Doi, D., Magotani, H., Onoe, H., Hayashi, T., Mizuma, H., Takara, S., Takahashi, R., Inoue, H., Morita, S., Yamamoto, M., Okita, K., Nakagawa, M., Parmar, M., & Takahashi, J. (2017). Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature Publishing Group*, 548(7669), 592–596. <https://doi.org/10.1038/nature23664>
- Kirkeby, A., Grealish, S., Wolf, D. A., Nelander, J., Wood, J., Lundblad, M., Lindvall, O., & Parmar, M. (2012). Generation of Regionally Specified Neural Progenitors and Functional Neurons from Human Embryonic Stem Cells under Defined Conditions. *Cell Reports*, 1(6), 703–714. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.04.009>
- Konovalova, E. V., Lopacheva, O. M., Grivennikov, I. A., Lebedeva, O. S., Dashinimaev, E. B., Khaspekov, L. G., Fedotova, E. Y., & Illarioshkin, S. N. (2015). Mutations in the Parkinson's Disease-Associated PARK2 Gene Are Accompanied by Imbalance in Programmed Cell Death Systems. *Acta Naturae*, 7(4), 146–149. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26798503>
- Koprich, J. B., Kalia, L. V., & Brotchie, J. M. (2017). Animal models of α -synucleinopathy for Parkinson disease drug development. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 18, Issue 9, pp. 515–529). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.75>
- Korecka, J. A., Talbot, S., Osborn, T. M., de Leeuw, S. M., Levy, S. A., Ferrari, E. J., Moskites, A., Atkinson, E., Jodelka, F. M., Hinrich, A. J., Hastings, M. L., Woolf, C. J., Hallett, P. J., & Isacson, O. (2019). Neurite Collapse and Altered ER Ca²⁺ Control in Human Parkinson Disease Patient iPSC-Derived Neurons with LRRK2 G2019S Mutation. *Stem Cell Reports*, 12(1), 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.11.021>
- Kriks, S., Shim, J. W., Piao, J., Ganat, Y. M., Wakeman, D. R., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., Buch, A., Yang, L., Beal, M. F., Surmeier, D. J., Kordower, J. H., Tabar, V., & Studer, L. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature*, 480(7378), 547–551. <https://doi.org/10.1038/nature10648>

- Lang, C., Campbell, K. R., Ryan, B. J., Carling, P., Attar, M., Vowles, J., Perestenko, O. V., Bowden, R., Baig, F., Kasten, M., Hu, M. T., Cowley, S. A., Webber, C., & Wade-Martins, R. (2019). Single-Cell Sequencing of iPSC-Dopamine Neurons Reconstructs Disease Progression and Identifies HDAC4 as a Regulator of Parkinson Cell Phenotypes. *Cell Stem Cell*, 24(1), 93–106. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.10.023>
- Lee, H., James, W. S., & Cowley, S. A. (2017). LRRK2 in peripheral and central nervous system innate immunity: Its link to Parkinson's disease. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 45, Issue 1, pp. 131–139). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BST20160262>
- Lee, M. O., Moon, S. H., Jeong, H. C., Yi, J. Y., Lee, T. H., Shim, S. H., Rhee, Y. H., Lee, S. H., Oh, S. J., Lee, M. Y., Han, M. J., Cho, Y. S., Chung, H. M., Kim, K. S., & Cha, H. J. (2013). Inhibition of pluripotent stem cell-derived teratoma formation by small molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(35). <https://doi.org/10.1073/pnas.1303669110>
- Li, H., Jiang, H., Zhang, B., & Feng, J. (2018). Modeling Parkinson's disease using patient-specific induced pluripotent stem cells. In *Journal of Parkinson's Disease* (Vol. 8, Issue 4, pp. 479–493). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JPD-181353>
- Li, W., Englund, E., Widner, H., Mattsson, B., Van Westen, D., Lätt, J., Rehnström, S., Brundin, P., Björklund, A., Lindvall, O., & Li, J. Y. (2016). Extensive graft-derived dopaminergic innervation is maintained 24 years after transplantation in the degenerating parkinsonian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(23), 6544–6549. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605245113>
- Li, X., James, S., & Lei, P. (2016). Interactions Between α -Synuclein and Tau Protein: Implications to Neurodegenerative Disorders. *Journal of Molecular Neuroscience*, 60(3), 298–304. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0829-1>
- Li, Y., Ibañez, D. P., Fan, W., Zhao, P., Chen, S., Md. Abdul, M., Jiang, Y., Fu, L., Luo, Z., Liu, Z., Yang, Y., Guo, J., Volpe, G., Kanwal, S., Wang, D., Tang, B., & Li, W. (2020). Generation of an induced pluripotent stem cell line (GIBHi004-A) from a Parkinson's disease patient with mutant DJ-1/PARK7 (p.L10P). In *Stem Cell Research* (Vol. 46, p. 101845). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101845>
- Liu, Z., & Cheung, H. H. (2020). Stem cell-based therapies for parkinson disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 21, pp. 1–17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21218060>
- Ludtmann, M. H. R., Angelova, P. R., Horrocks, M. H., Choi, M. L., Rodrigues, M., Baev, A. Y., Berezhnov, A. V., Yao, Z., Little, D., Banushi, B., Al-Menhali, A. S., Ranasinghe, R. T., Whiten, D. R., Yapom, R., Dolt, K. S., Devine, M. J., Gissen, P., Kunath, T., Jaganjac, M., ... Gandhi, S. (2018). α -synuclein oligomers interact with ATP synthase and open the permeability transition pore in Parkinson's disease. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04422-2>
- Mahajani, S., Raina, A., Fokken, C., Kügler, S., & Bähr, M. (2019). Homogenous generation of dopaminergic neurons from multiple hiPSC lines by transient expression of transcription

- factors. *Cell Death & Disease*, 10(12), 898. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2133-9>
- Mazzulli, J. R., Zunke, F., Isacson, O., Studer, L., & Krainc, D. (2016). α -Synuclein-induced lysosomal dysfunction occurs through disruptions in protein trafficking in human midbrain synucleinopathy models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(7), 1931–1936. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520335113>
- Milanese, C., Cerri, S., Ulusoy, A., Gornati, S. V., Plat, A., Gabriels, S., Blandini, F., Di Monte, D. A., Hoeijmakers, J. H., & Mastroberardino, P. G. (2018). Activation of the DNA damage response in vivo in synucleinopathy models of Parkinson's disease. *Cell Death and Disease*, 9(818). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0848-7>
- Miller, J. D., Ganat, Y. M., Kishinevsky, S., Bowman, R. L., Liu, B., Tu, E. Y., Mandal, P. K., Vera, E., Shim, J. W., Kriks, S., Taldone, T., Fusaki, N., Tomishima, M. J., Krainc, D., Milner, T. A., Rossi, D. J., & Studer, L. (2013). Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell*, 13(6), 691–705. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.11.006>
- Munsie, L. N., Milnerwood, A. J., Seibler, P., Beccano-Kelly, D. A., Tatarnikov, I., Khinda, J., Volta, M., Kadgien, C., Cao, L. P., Tapia, L., Klein, C., & Farrer, M. J. (2015). Retromer-dependent neurotransmitter receptor trafficking to synapses is altered by the Parkinson's disease VPS35 mutation p.D620N. *Human Molecular Genetics*, 24(6), 1691–1703. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu582>
- Nguyen, M., & Krainc, D. (2018). LRRK2 phosphorylation of auxilin mediates synaptic defects in dopaminergic neurons from patients with Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(21), 5576–5581. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717590115>
- Paillusson, S., Gomez-Suaga, P., Stoica, R., Little, D., Gissen, P., Devine, M. J., Noble, W., Hanger, D. P., & Miller, C. C. J. (2017). α -Synuclein binds to the ER–mitochondria tethering protein VAPB to disrupt Ca^{2+} homeostasis and mitochondrial ATP production. *Acta Neuropathologica*, 134(1), 129–149. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1704-z>
- Pan, P. Y., Li, X., Wang, J., Powell, J., Wang, Q., Zhang, Y., Chen, Z., Wicinski, B., Hof, P., Ryan, T. A., & Yue, Z. (2017). Parkinson's disease-associated LRRK2 hyperactive kinase mutant disrupts synaptic vesicle trafficking in ventral midbrain neurons. *Journal of Neuroscience*, 37(47), 11366–11376. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0964-17.2017>
- Parmar, M., Grealish, S., & Henchcliffe, C. (2020). The future of stem cell therapies for Parkinson disease. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 21, Issue 2, pp. 103–115). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0257-7>
- Pickrell, A. M., & Youle, R. J. (2015). The roles of PINK1, Parkin, and mitochondrial fidelity in parkinson's disease. In *Neuron* (Vol. 85, Issue 2, pp. 257–273). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.007>
- Playne, R., & Connor, B. (2017). *Understanding Parkinson's Disease through the Use of Cell Reprogramming* (Vol. 13, pp. 151–169). Stem Cell Reviews and Reports. <https://doi.org/10.1007/s12015-017-9717-5>

- Prots, I., Grosch, J., Brazdis, R. M., Simmnacher, K., Veber, V., Havlicek, S., Hannappel, C., Krach, F., Krumbiegel, M., Schütz, O., Reis, A., Wrasidlo, W., Galasko, D. R., Groemer, T. W., Masliah, E., Schlötzer-Schrehardt, U., Xiang, W., Winkler, J., & Winner, B. (2018). α -Synuclein oligomers induce early axonal dysfunction in human iPSC-based models of synucleinopathies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(30), 7813–7818. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713129115>
- Rai, N., Singh, A. K., Singh, S. K., Gaurishankar, B., Kamble, S. C., Mishra, P., Kotiya, D., Barik, S., Atri, N., & Gautam, V. (2020). Recent technological advancements in stem cell research for targeted therapeutics. *Drug Delivery and Translational Research*, 10(4), 1147–1169. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00766-9>
- Raza, C., Anjum, R., & Shakeel, N. ul A. (2019). Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sciences*, 226, 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.03.057>
- Ren, C., Wang, F., Guan, L.-N., Cheng, X.-Y., Zhang, C.-Y., Geng, D.-Q., & Liu, C.-F. (2019). A compendious summary of Parkinson's disease patient-derived iPSCs in the first decade. *Annals of Translational Medicine*, 7(22), 685–685. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.11.16>
- Ren, Y., Jiang, H., Hu, Z., Fan, K., Wang, J., Janoschka, S., Wang, X., Ge, S., & Feng, J. (2015). Parkin mutations reduce the complexity of neuronal processes in iPSC-derived human neurons. *Stem Cells*, 33(1), 68–78. <https://doi.org/10.1002/stem.1854>
- Ryan, T., Bamm, V. V., Stykel, M. G., Coackley, C. L., Humphries, K. M., Jamieson-Williams, R., Ambasadhan, R., Mosser, D. D., Lipton, S. A., Harauz, G., & Ryan, S. D. (2018). Cardiolipin exposure on the outer mitochondrial membrane modulates α -synuclein. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03241-9>
- Salari, S., & Bagheri, M. (2019). In vivo, in vitro and pharmacologic models of Parkinson's disease. *Physiological Research*, 68(1), 17–24. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933895>
- Sánchez-Danés, A., Richaud-Patin, Y., Carballo-Carbajal, I., Jiménez-Delgado, S., Caig, C., Mora, S., Di Guglielmo, C., Ezquerra, M., Patel, B., Giralt, A., Canals, J. M., Memo, M., Alberch, J., López-Barneo, J., Vila, M., Cuervo, A. M., Tolosa, E., Consiglio, A., & Raya, A. (2012). Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Molecular Medicine*, 4(5), 380–395. <https://doi.org/10.1002/emmm.201200215>
- Schöndorf, D. C., Aureli, M., McAllister, F. E., Hindley, C. J., Mayer, F., Schmid, B., Sardi, S. P., Valsecchi, M., Hoffmann, S., Schwarz, L. K., Hedrich, U., Berg, D., Shihabuddin, L. S., Hu, J., Pruszek, J., Gygi, S. P., Sonnino, S., Gasser, T., & Deleidi, M. (2014). iPSC-derived neurons from GBA1-associated Parkinson's disease patients show autophagic defects and impaired calcium homeostasis. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms5028>
- Schulze, M., Sommer, A., Plötz, S., Farrell, M., Winner, B., Grosch, J., Winkler, J., & Riemenschneider, M. J. (2018). Sporadic Parkinson's disease derived neuronal cells show disease-specific mRNA and small RNA signatures with abundant deregulation of piRNAs.

- Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0561-x>
- Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C., & Yamanaka, S. (2017). Induced pluripotent stem cell technology: A decade of progress. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 16, Issue 2, pp. 115–130). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.245>
- Simmnacher, K., Lanfer, J., Rizo, T., Kaindl, J., & Winner, B. (2020). Modeling Cell-Cell Interactions in Parkinson's Disease Using Human Stem Cell-Based Models. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 13, Issue 517). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00571>
- Simon, D. K., Tanner, C. M., & Brundin, P. (2020). Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. In *Clinics in Geriatric Medicine* (Vol. 36, Issue 1, pp. 1–12). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.08.002>
- Soldner, F., Laganière, J., Cheng, A. W., Hockemeyer, D., Gao, Q., Alagappan, R., Khurana, V., Golbe, L. I., Myers, R. H., Lindquist, S., Zhang, L., Guschin, D., Fong, L. K., Vu, B. J., Meng, X., Urnov, F. D., Rebar, E. J., Gregory, P. D., Zhang, H. S., & Jaenisch, R. (2011). Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset parkinson point mutations. *Cell*, 146(2), 318–331. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.019>
- Stathakos, P., Jiménez-Moreno, N., Crompton, L. A., Nistor, P. A., Badger, J. L., Barbuti, P. A., Kerrigan, T. L., Randall, A. D., Caldwell, M. A., & Lane, J. D. (2020). A monolayer hiPSC culture system for autophagy/mitophagy studies in human dopaminergic neurons. *Autophagy*, 1–17. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1739441>
- Stoddard-Bennett, T., & Pera, R. (2020). Stem cell therapy for Parkinson's disease: Safety and modeling. *Neural Regeneration Research*, 15(1), 36–40. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.264446>
- Stoddard-Bennett, T., & Reijo Pera, R. (2019). Treatment of Parkinson's Disease through Personalized Medicine and Induced Pluripotent Stem Cells. *Cells*, 8(1), 26. <https://doi.org/10.3390/cells8010026>
- Takahashi, J. (2019). *Preparing for first human trial of induced pluripotent stem cell-derived cells for Parkinson's disease: an interview with Jun Takahashi*. 14(2), 93–95.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(3), 183–193. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.8>
- Torrent, R., De Angelis Rigotti, F., Dell'Era, P., Memo, M., Raya, A., & Consiglio, A. (2015). Using iPS Cells toward the Understanding of Parkinson's Disease. *Journal of Clinical Medicine*, 4(4), 548–566. <https://doi.org/10.3390/jcm4040548>
- Tysnes, O. B., & Storstein, A. (2017). Epidemiology of Parkinson's disease. In *Journal of Neural Transmission* (Vol. 124, Issue 8, pp. 901–905). Springer-Verlag Wien. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1686-y>
- Vadodaria, K. C., Jones, J. R., Linker, S., & Gage, F. H. (2020). Modeling brain disorders using induced pluripotent stem cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 12(6), 1–15.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035659>

- Vilariño-Güell, C., Wider, C., Ross, O. A., Dachsel, J. C., Kachergus, J. M., Lincoln, S. J., Soto-Ortolaza, A. I., Cobb, S. A., Wilhoite, G. J., Bacon, J. A., Bahareh Behrouz, Melrose, H. L., Hentati, E., Puschmann, A., Evans, D. M., Conibear, E., Wasserman, W. W., Aasly, J. O., Burkhard, P. R., ... Farrer, M. J. (2011). VPS35 mutations in parkinson disease. *American Journal of Human Genetics*, 89(1), 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.06.001>
- Walter, J., Bolognin, S., Antony, P. M. A., Nickels, S. L., Poovathingal, S. K., Salamanca, L., Magni, S., Perfeito, R., Hoel, F., Qing, X., Jarazo, J., Arias-Fuenzalida, J., Ignac, T., Monzel, A. S., Gonzalez-Cano, L., Pereira de Almeida, L., Skupin, A., Tronstad, K. J., & Schwamborn, J. C. (2019). Neural Stem Cells of Parkinson's Disease Patients Exhibit Aberrant Mitochondrial Morphology and Functionality. *Stem Cell Reports*, 12(5), 878–889. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.03.004>
- Weng, S. J., Li, I. H., Huang, Y. S., Chueh, S. H., Chou, T. K., Huang, S. Y., Shiue, C. Y., Cheng, C. Y., & Ma, K. H. (2017). KA-bridged transplantation of mesencephalic tissue and olfactory ensheathing cells in a Parkinsonian rat model. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11(7), 2024–2033. <https://doi.org/10.1002/term.2098>
- Woodard, C. M., Campos, B. A., Kuo, S. H., Nirenberg, M. J., Nestor, M. W., Zimmer, M., Mosharov, E. V., Sulzer, D., Zhou, H., Paull, D., Clark, L., Schadt, E. E., Sardi, S. P., Rubin, L., Eggan, K., Brock, M., Lipnick, S., Rao, M., Chang, S., ... Noggle, S. A. (2014). iPSC-derived dopamine neurons reveal differences between monozygotic twins discordant for parkinson's disease. *Cell Reports*, 9(4), 1173–1182. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.023>
- Xiao, B., Ng, H. H., Takahashi, R., & Tan, E. (2016). Induced pluripotent stem cells in Parkinson's disease: scientific and clinical challenges. In *Neurol Neurosurg Psychiatry* (Issue 87, pp. 697–702). <https://doi.org/10.1136/jnnp-2015-312036>
- Zheng, W., & Chen, Z. (2019). Generation of induced neural stem cells from peripheral mononuclear cells and differentiation toward dopaminergic neuron precursors for transplantation studies. In *Journal of Visualized Experiments* (Issue 149). Journal of Visualized Experiments. <https://doi.org/10.3791/59690>
- Zygogianni, O., Antoniou, N., Kalomoiri, M., Kouroupi, G., Taoufik, E., & Matsas, R. (2019). In Vivo Phenotyping of Familial Parkinson's Disease with Human Induced Pluripotent Stem Cells: A Proof-of-Concept Study. *Neurochemical Research*, 44(6), 1475–1493. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02781-w>